Série A, nº 3942
Nº d'Ordre :
4793

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre VOLFIN

1ère **THESE.** — "Étude du taux et de la vitesse de renouvellement du phosphate minéral, de la phosphocréatine et des mononucléotides libres dans le muscle strié et le muscle lisse sous l'influence de diverses actions hormonales".

2ème **THESE.** — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 27 JUIN 1962 **devant la Commission d'examen.**

M. LEDERER *Président.*

Mme CHAIX
M. MOREL
} *Examinateurs.*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549214_0013

Série A, nº 3942
Nº d'Ordre :
4793

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre VOLFIN

1ère **THESE.** – "Étude du taux et de la vitesse de renouvellement du phosphate minéral, de la phosphocréatine et des mononucléotides libres dans le muscle strié et le muscle lisse sous l'influence de diverses actions hormonales".

2ème **THESE.** – Propositions données par la Faculté.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Soutenues le **devant la Commission d'examen.**

M. LEDERER *Président.*

Mme CHAIX
M. MOREL } *Examinateurs.*

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Janvier 1962)

- PROFESSEURS -

Doyen : **M. ZAMANSKY**

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T	Chimie organique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (ORSAY).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRETIEN	T	Chimie minérale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIERE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim.
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécan. expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HERITIER	T	Biologie Générale (ORSAY).
GRIVET	T	Radioélectricité (ORSAY).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et struct.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (ORSAY).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Biol. animale (P.C.B.).
MAY	T	Zoologie (ORSAY).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des solides (ORSAY).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul différentiel et intégral.
NORMANT	T	Synthèse organique générale.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUE	T	Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARECHAL	T	Optique théorique et appl.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition.
SALEM	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
PISOT	T	Technique mathématique de la physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMAN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (ORSAY).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.

AIGRAIN	T	Electrotechnique générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (ORSAY).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.).
BRUN	T	Mécan. théorique des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agreg.).
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
MICHEL André	T	Chimie minérale (ORSAY).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (ORSAY).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER		Physiologie comparée.
CAMUS		Physiologie végétale (B.M.P.V.).
CASTAING	T	Physique (ORSAY).
CURIEN	T	Minéralogie et cristallogr.
MOYSE	T	Physiologie végétale (ORSAY).
NOIROT		Evolution des êtres organisés.
PANNETIER	T	Chimie générale (ORSAY).
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMAN	T	Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie physico-chim.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART		Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (ORSAY).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biologie végétale S.P.C.N. (ORSAY).
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).
Mlle JOSIEN	T	Chimie S.P.C.N.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (ORSAY).
CHAPELLE	T	Physique (ORSAY).
DELANGE	T	Mathématiques (ORSAY).
DENY	T	Mathématiques générales (ORSAY).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des hautes énergies (ORSAY).
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie.
FRIEDEL		Physique des solides (ORSAY).
M. JULIA		Etudes des molécules naturelles complexes.
LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N.) ORSAY
MAGAT		Physico-chimie des radio-léments.
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiologie animale (ORSAY).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie.
LEMEE	T	Physiologie vég. B.M.P.V. (ORSAY).
GUERIN	T	Chimie M.P.C. (ORSAY).
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.).
JEAN	T	Physique nucléaire (ORSAY).
MATTLER	T	Physique S.P.C.N. (ORSAY).
MICHEL Louis		Physique théor. des hautes énergies (ORSAY).
BERGERARD		Zoologie (ORSAY).
BERTEIN		Electronique (ORSAY).
BOUISSIERES		Chimie des radioéléments (ORSAY).
Mme COUTURE		Thermodynamique et mécanique physique.
ELLENBERGER		Géologie appliquée sur le terrain.
FRANC		Biol. animale (P.C.B.).
SCHNELL		Botanique tropicale (ORSAY).
STOLKOWSKI		Physiologie générale.
ACHER		Chimie biol. (ORSAY).
BAUDOIN		Biologie animale P.C.B.
BEAUMONT		Biologie animale S.P.C.N.
BLAMONT		Géophysique ionosphère.
BOURREAU		Botanique.
CURIE D.		Physique (M.G.P.).
DURAND-DELGA		Géologie.
FREON	T	Chimie organique (ORSAY).
HELLER		Physiologie végétale.
TORTRAT		Calcul des probabilités.
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.).
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat	T	Méc. analytique et méc. céleste.
Mlle VEIL		Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNSCK	T	Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires.
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (ORSAY).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques M.P.C. (ORSAY).
MAZET	T	Mécanique générale (ORSAY).
CAIRE		Géographie phys. et Géol. Dynamique.
COMOLET		Mécanique des fluides.
CORABŒUF		Physiologie animale.
DELLOUE		Physique de l'exosphère.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie animale P.C.B.
JULLIEN J.		Chimie P.C.B.
MALGRANGE		Tech. math. de la phys.
OLIVIER		Antropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE		Physique ENS. (Orsay).

Secrétaire général : R. POULLAIN

INTRODUCTION

I - ROLE DES NUCLEOTIDES DANS LE METABOLISME ET MESURE DE LEUR TAUX ET DE LEUR VITESSE DE RENOUVELLEMENT DANS LES TISSUS.

A - Rôle des nucléotides dans le métabolisme.

Le rôle des phosphates dans le métabolisme énergétique est connu depuis de nombreuses années. L'énergie provenant des réactions exergoniques de la cellule est en général captée par des composés phosphorylés, les nucléotides à liaisons riches en énergie, qui permettent aux réactions endergoniques indispensables à la vie de la cellule de se produire.

Parmi ces nucléotides, les nucléotides adényliques jouent un rôle essentiel dans le métabolisme de la cellule, les nucléotides cytidyliques, uridyliques et guanyliques ne sont nécessaires que dans un nombre de cas plus limité.

L'ATP intervient dans la plupart des réactions d'activation au cours du catabolisme et de l'anabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des protéines. L'activation du glucose par l'ATP, catalysée par l'hexokinase, conduit au glucose-6-phosphate, puis à des réactions menant soit à la synthèse de glycogène, soit à l'oxydation directe du glucose par la voie du cycle des pentoses, soit à la glycolyse anaérobie, où l'ATP intervient une nouvelle fois dans la réaction de formation du fructose-1,6-diphosphate, catalysée par la phosphofructokinase. Au cours de ces réactions, l'ATP se transforme en ADP, la phosphorylation ne faisant intervenir que son phosphate terminal.

L'ATP intervient dans les réactions d'activation conduisant à la dégradation des acides gras: (1). L'acide gras est transformé en acyl-adénylate, et les deux phosphates labiles de l'ATP sont libérés à l'état de pyrophosphate (2, 3).

Au cours de la synthèse protéique, l'ATP intervient en activant les acides aminés en adénylates d'acides aminés (4) également avec libération de pyrophosphate. En revanche, c'est par des réactions ne mettant en jeu que son groupe phosphorylé terminal,que l'ATP intervient dans la synthèse de certains peptides simples comme le glutathion, l'ansérine, la carnosine.

L'ATP est nécessaire aux réactions d'activation des sulfates aboutissant aux composés sulfonés avec formation intermédiaire d'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) et de 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) (5, 6); l'ATP est également nécessaire à l'activation de la méthionine en S-adénosyl-méthionine qui participe au transfert des groupes méthyl.

L'ATP intervient dans la synthèse d'un grand nombre de coenzymes: diphosphopyridine nucléotide, triphosphopyridine nucléotide, pyridoxal-phosphate.

Au cours de la biosynthèse des acides nucléiques, l'ATP participe à des réactions d'activation aboutissant à la formation d'adénylates d'acide ribonucléique grâce à un enzyme, la RNA adénylate-pyrophosphorylase. La signification physiologique de cette réaction est encore incertaine (7, 8). L'ATP participe également à l'incorporation de ribonucléotides dans les polyribonucléotides, réaction qui n'a lieu qu'en présence d'acide désoxyribonucléique (9), et à la phosphorylation des nucléotides monophosphates, UMP, GMP et CMP, précurseurs de l'acide ribonucléique. L'UTP, le GTP, le CTP ont également un rôle spécifique dans certaines réactions du métabolisme, comme il sera indiqué plus loin.

Un certain nombre de réactions de carboxylation nécessite de l'ATP: la formation de malonyl-coenzyme A par carboxylation de l'acétyl-coenzyme A (10, 11), qui est la réaction limitante dans la synthèse des acides gras; la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate (12); la carboxylation du ribulose-1,5-diphosphate, catalysée par la phosphoribulokinase, au cours de la photosynthèse (13).

L'ATP est nécessaire aux réactions permettant la motilité. L'ATP par son action sur l'actomyosine et la conversion de l'actine G en actine F permet la contraction musculaire. Il est généralement admis que l'hydrolyse du groupe terminal

de l'ATP fournit l'énergie nécessaire à la contraction musculaire elle-même, bien que la démonstration directe de ce phénomène dans le muscle in vitro ou dans le muscle en survie stimulé électriquement n'ait pas jusqu'ici été faite. Cette question a été récemment revue en détail par Mommaerts et al. (14).

L'ATP intervient également dans le mécanisme de transduction qui permet aux chromosomes de se mouvoir au moment de la mitose (15).

L'ATP apporte en grande partie l'énergie nécessaire aux mécanismes de transports actifs et au maintien du gradient ionique assurant le potentiel de membrane. Ce rôle a été démontré (à l'aide d'inhibiteurs des phosphorylations tels que le 2,4-dinitrophénol) sur le nerf, où l'ATP est nécessaire au processus de récupération qui implique un mouvement couplé de sodium et de potassium (16), sur les érythrocytes (17) où l'ATP est hydrolysé par un enzyme insoluble, cette hydrolyse étant couplée au transport actif de sodium et de potassium (18). Dans le cas du muscle le rôle de l'ATP comme principale source énergétique assurant le transport actif de Na et de K a été montré par Caldwell (19).

Les nucléotides uridyliques interviennent dans la biosynthèse de polyosides. Dans le muscle l'une des voies de synthèse du glycogène nécessite l'UDP-glucose-glycogène transglycosylase (20). Les uridine nucléotides participent à la biosynthèse des polysaccharides contenant des osamines (uridine diphosphoacétyl-glucosamine), des acides uroniques (acide UDP-glucuronique ou galacturonique) et de l'acide neuraminique. Les uridine nucléotides sont les intermédiaires de la biosynthèse des glycopeptides qui constituent la paroi cellulaire des bactéries (21).

Les nucléotides guanyliques jouent un rôle important dans la synthèse des protéines par les systèmes enzymatiques de la cellule. Le transfert de l'acide aminé lié à l'acide désoxyribonucléique sur les protéines des microsomes nécessite la présence de GTP (22, 23).

Les guanosine nucléotides interviendraient d'une façon analogue aux uridine nucléotides dans la synthèse des polysaccharides et des hétéropolysaccharides. Le GDP-mannose qui pourrait servir à la synthèse des glycoprotéines a été isolé par différents auteurs (24, 25). On a isolé également du GDP-glucose, du GDP-fructose (26) et du GDP-désoxymannose (27).

Les nucléotides cytidyliques sont nécessaires à la biosynthèse des phospholipides, en particulier dans la réaction de transfert de la choline sur les glycérides pour aboutir à la formation de lécithine (28) et les réactions de synthèse de la sphingomyéline.(29).

Formation de l'ATP:

L'ATP se forme essentiellement au cours de la glycolyse, des phosphorylations oxydatives et des réactions de phosphorylation intervenant dans la photosynthèse (30, 31): la photophosphorylation cyclique ou non cyclique des plantes supérieures et des bactéries photosynthétiques. Ces réactions qui aboutissent à la formation d'ATP comprennent, comme chez les organismes supérieurs, des transferts d'électrons liés à des phosphorylations.

Dans les réactions de phosphorylation aboutissant à l'ATP, l'ADP est l'accepteur spécifique de phosphate et ne peut être remplacé par aucun autre accepteur de phosphate sauf dans la réaction α-cétoglutarate ⟶ succinate (32) où le GDP est accepteur de phosphate.

$$\alpha\text{-cétoglutarate} + DPN + CoA \longrightarrow \text{Succinyl-CoA} + DPNH + H^+ + CO_2$$
$$\text{succinyl-CoA} + P.i. + GDP \rightleftharpoons GTP + \text{succinate} + CoA$$
$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

$$\alpha\text{-cétoglutarate} + DPN + P.i. + ADP \longrightarrow \text{Succinate} + DPNH + H^+ + CO_2 + ATP$$

Formation des uridine, guanosine et cytidine di- et triphosphates:

Ces composés se forment d'une façon générale par phosphorylation enzymatique aux dépens de l'ATP, du mononucléotide correspondant.

Les composés riches en énergie jouent un rôle de plaque tournante entre les réactions endergoniques et exergoniques du métabolisme. Il n'est cependant pas exclu que ces réactions puissent être couplées directement, sans intervention d'une liaison riche en énergie, notamment dans le cas des biosynthèses réductives exigeant TPNH; un exemple d'un tel couplage direct existe dans la réaction réversible de décarboxylation oxydative de l'acide L-malique en acide pyruvique et CO_2, catalysée par un enzyme, la β-décarboxylase, décrit par Ochoa ("malic enzyme") (33) et couplée à la réduction de TPN en TPNH.

Il n'est pas exclu qu'existent d'autres réactions de ce genre.

B - Mesure du taux et de la vitesse de renouvellement des nucléotides dans les tissus.

Etant donné le rôle joué par les nucléotides dans les principales réactions cellulaires, l'étude de ces composés peut donner des renseignements sur le métabolisme. Ceci était pratiquement impossible, tant que le fractionnement des phosphates, ne pouvait se faire qu'en utilisant des méthodes aussi primitives, que la séparation suivant la vitesse d'hydrolyse en milieu acide ou la séparation à l'état de sels de baryum, comme nous le verrons plus loin. Depuis quelques années, on utilise des méthodes chromatographiques spécifiques, dont la première fut celle décrite par Hurlbert et al. (34), qui ont été considérablement perfectionnées. Ces techniques ont permis de séparer les nucléotides des tissus et d'envisager la détermination de la vitesse de renouvellement de leurs phosphates. L'intérêt d'une telle mesure dans l'étude des régulations métaboliques, est évident: une telle étude pourrait notamment faciliter la localisation rapide d'un changement induit par une hormone dans l'activité métabolique d'un tissu chez l'animal vivant, ou d'un tissu en survie. Elle permettrait de déceler presque immédiatement des changements que la détermination des produits terminaux d'une chaîne métabolique (dosage de glycogène, d'acide lactique, des acides gras etc...) ne permet d'obtenir qu'après un temps beaucoup plus long. De même, il est bien évident qu'une telle méthode devrait permettre de mesurer des réactions trop rapides pour être décelées par d'autres moyens par exemple la déphosphorylation et la rephosphorylation de l'ATP au cours de la contraction musculaire.

Les tentatives faites jusqu'ici pour obtenir des informations sur le métabolisme au moyen de la mesure des phosphates labiles dans les nucléotides chez l'animal vivant n'ont cependant pas été couronnées de succès. La raison de cet échec est double: d'une part, la radioactivité se répartit entre les différents phosphates labiles des nucléotides et des autres composés phosphorylés avec une très grande rapidité, ce qui provoque un équilibre isotopique pratiquement instantané entre ces différents composés; d'autre part, dans certains tissus comme le muscle, le phosphate radioactif ne pénètre que très lentement dans l'espace intracellulaire de sorte que l'activité spécifique des composés organiques reste toujours très faible.

De telles constatations ont été faites par de nombreux auteurs: Fleckenstein (35, 36), Sacks (37), Tsuboi (38), ainsi qu'au cours du présent travail.

En revanche, la vitesse de renouvellement des phosphates labiles des nucléotides a été relativement peu étudiée dans les organes en survie; la seule étude systématique qui ait été faite est celle de Fleckenstein et al.(35, 36, 39) sur le muscle cardiaque. Dans ces conditions, il semble que l'incorporation du phosphate inorganique dans certains phosphates organiques labiles est fortement ralentie, ce qui doit permettre de mesurer l'influence de l'état physiologique dans lequel se trouve le tissu et notamment du contrôle hormonal auquel il est soumis.

Les résultats essentiels du présent travail comportent la mesure du taux et de la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés de l'extrait dit "acido soluble" d'un muscle strié (diaphragme de rat) et d'un muscle lisse (utérus de rat). Le diaphragme a été choisi parcequ'il sert depuis de nombreuses années à l'étude de l'influence d'hormones, comme l'insuline et l'hormone de croissance antéhypophysaire sur le muscle strié. Le fait que l'insuline exerce une action in vitro facile à mettre en évidence sur le diaphragme (40) devrait permettre la mesure d'un effet pratiquement instantané d'une hormone sur un tissu.

L'utérus, d'autre part, est un organe sur lequel le contrôle hormonal par les oestrogènes et la progestérone est particulièrement facile à mettre en évidence. Dans ce cas, cependant, aucune action immédiate in vitro sur le métabolisme n'a pu être démontrée avec certitude. L'étude entreprise se borne donc actuellement, comme pour l'action de l'hormone de croissance sur le diaphragme, à étudier l'influence d'injections de ces hormones sur le métabolisme des composés phosphorylés acido-solubles observée in vitro.

II - ACTION DE L'INSULINE ET DE L'HORMONE DE CROISSANCE ANTEHYPOPHYSAIRE SUR LE METABOLISME DU MUSCLE STRIE.

A - Insuline.

Chez l'animal comme chez l'homme un défaut d'insuline, le diabète sucré, entraîne des troubles du métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des protéines. Le diabète se manifeste par un taux très élevé du glucose dans le sang. Ceci pourrait être dû, soit à une production accrue du glucose par le foie, soit à une diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. C'est

essentiellement sur ces tissus périphériques, tels le muscle et le tissu adipeux, que l'on a mis en évidence une action immédiate et directe de l'insuline, analogue in vitro à ce qu'elle est sur l'animal intact.

1- Action de l'insuline sur le métabolisme des sucres.

Gemmill, le premier, en 1940, a montré (40) que le diaphragme isolé répondait à l'addition d'insuline par une utilisation accrue de glucose et une synthèse de glycogène. Cet effet rapide de l'insuline se distingue de la réponse du tissu hépatique qui répond à l'insuline (41, 42), d'une façon moins nette que le muscle: les effets les plus caractéristiques de l'insuline sur le foie diabétique n'apparaissent qu'après plusieurs heures. Les troubles profonds,constatés dans le diabète,du métabolisme des hydrates de carbone et des lipides, expliquent que les premiers auteurs ayant étudié le mode d'action de l'insuline aient supposé que l'action de cette hormone portait sur les toutes premières étapes du catabolisme des hydrates de carbone: une action sur la pénétration du glucose ou sur sa première phosphorylation catalysée par l'hexokinase.

En 1946, Cori et ses collaborateurs (43) ont étudié l'influence de l'insuline sur des homogénats de muscle: ils trouvèrent sur ces homogénats une inhibition de la réaction hexokinasique par des extraits hypophysaires et surrénaliens; cette inhibition était levée par l'insuline. Ces résultats n'ont pas pu être reproduits quelques années plus tard par Stadie et Haugaard (44) qui ont critiqué les données de Cori. Cette critique semblait d'autant plus justifiée, qu'en 1953, Levine et Goldstein (45) étudiant l'espace de distribution de certains hexoses et pentoses non métabolisables dans le muscle du chien éviscéré et nephrectomisé, avaient montré que certains de ces sucres répondent à une injection d'insuline par une pénétration accrue dans l'espace intracellulaire. Ces auteurs précisèrent leur travail en étudiant l'espace de distribution de toute une série de sucres, et ses variations sous l'influence de l'insuline. Les sucres qui répondent par une pénétration accrue après action de l'insuline se caractérisent par une configuration analogue à celle du glucose dans leurs trois premiers atomes de carbone (D-galactose, D-xylose, L-arabinose). Dans ce cas, l'action de l'insuline ne peut s'exercer sur une phosphorylation puisque ces sucres ne sont pas métabolisables dans le muscle,mais s'exerce sur la pénétration. D'où la conclusion que l'entrée des sucres dans les tissus, en

particulier le muscle, est sous la dépendance d'un système de transfert spécifique d'une certaine structure chimique du substrat. Cori et Kipnis étudièrent les données de Levine et Goldstein sur le diaphragme intact (46) disséqué sans couper l'extrémité des fibres musculaires, afin d'être certains de ne pas créer de points de pénétration. Sur ce diaphragme ("caged diaphragm"), ils étudièrent la pénétration des sucres non métabolisables. Ces travaux ont été poursuivis ces dernières années principalement par Cori et Kipnis sur le diaphragme isolé de rat (47, 48) et par Park et ses collaborateurs sur le coeur de rat isolé et perfusé (49). Ils ont permis d'étudier séparément l'influence de l'insuline sur la pénétration des sucres et leur phosphorylation.

Plusieurs sucres ou analogues de sucres ont été utilisés au cours de cette étude:

- le D-sorbitol, alcool analogue du glucose, qui ne pénètre pas dans la cellule et reste confimé dans l'espace extracellulaire.
- les sucres non métabolisables sensibles à l'action de l'insuline (L-arabinose, D-xylose, D-3-O-méthylglucose).
- les sucres partiellement métabolisables, comme le 2-désoxyglucose, qui est phosphorylé en 2-désoxyglucose-6-phosphate. Ce composé ne peut être utilisé par la cellule et s'accumule.
- le glucose qui est entièrement métabolisable.

a) Etude de la pénétration des sucres.

Sur le coeur isolé, Park a montré (49),en utilisant le D-sorbitol, que le phénomène de diffusion des capillaires vers l'espace extracellulaire est presque instantané; l'équilibre est atteint en 30 secondes.

En étudiant la pénétration des sucres non métabolisables de l'espace extracellulaire dans l'espace intracellulaire, Park a trouvé des résultats identiques à ceux de Levine et Goldstein et de Kipnis et Cori: il a constaté, que cette entrée obéissait à une cinétiquecompatible avec l'équation de Michaelis-Menten. Cela ne veut pas dire que le phénomène de transport soit un phénomène enzymatique au sens strict du mot, mais signifie qu'il y a dans la membrane un système de transport qui se combine avec le glucose de la même manière qu'un enzyme se combine avec son substrat. Une diffusion libre est donc exclue, ce qui est en contradiction avec

certains résultats de Kipnis et Cori (47) qui, étudiant le Q_{10} de la pénétration des sucres dans le muscle, trouvèrent qu'il était égal à 1 en absence d'insuline. En revanche, le Q_{10} de la pénétration supplémentaire est d'environ 2 en présence d'insuline. Le Q_{10} de 1 correspond à une diffusion libre des sucres à travers la membrane: la contradiction entre ces résultats et ceux de Park n'a pas encore été expliquée. Dans une autre série d'expériences, Park a démontré que la sortie des sucres qui ont pénétré à l'intérieur de la cellule et n'ont pas été métabolisés est également un phénomène actif qui obéit aux mêmes lois que celles de l'entrée. L'ensemble de ces résultats ont conduit Park à imaginer un système de transport réversible des sucres à travers la membrane ("shuttle"). Ce système est extrêmement sensible à l'action de l'insuline. Cette action de l'insuline pourrait impliquer la combinaison de son pont disulfure avec un récepteur protéique du muscle, comme semblerait le montrer une expérience récente de Park et al. (50) au moyen de N-étyl-maléimide. L'étude du mécanisme d'action de l'ocytocine (51) et de la vasopressine (52, 53) avait permis d'envisager une telle réaction.

b) Etude de la phosphorylation des sucres.

La phosphorylation du glucose étant un phénomène enzymatique, elle obéit aux lois de Michaëlis-Menten. Park a trouvé (54) que la vitesse de phosphorylation est diminuée, dans le diabète, à toutes les concentrations physiologiques de glucose et que, si l'insuline pouvait antagoniser in vitro la diminution de vitesse de pénétration, même chez le rat diabétique, elle ne pouvait d'aucune façon restaurer la vitesse de phosphorylation.

2 - Action de l'insuline sur le métabolisme des acides gras.

La pénétration accrue de glucose sous l'action de l'insuline peut avoir un retentissement sur un autre métabolisme, celui des acides gras. Le rôle de l'insuline sur la lipogénèse a été étudié in vitro sur trois tissus: le foie, la glande mammaire et le tissu adipeux.

Les résultats les plus importants ont été obtenus sur le tissu adipeux isolé par Winegrad et Renold et par Ball et ses collaborateurs (55, 56, 57) qui montrèrent en utilisant du glucose marqué par ^{14}C, que l'insuline provoque une augmentation du quotient respiratoire jusqu'à des valeurs supérieures à 1, ce qui

indique une biosynthèse d'acides gras à longue chaîne.

Cet effet de l'insuline dépend de la présence de glucose ce qui indiquerait que l'augmentation de la synthèse d'acides gras sous l'influence de l'insuline est la conséquence d'une augmentation de l'entrée du glucose dans le tissu adipeux.

3 - Action de l'insuline en absence de glucose.

Plusieurs auteurs ont rapporté, au cours de ces dernières années, un net effet de l'insuline s'exerçant aussi bien sur le muscle que sur le tissu adipeux en absence de tout glucose ajouté.

Wool et Krahl (58), Manchester et Krahl (59), Manchester et Young (60), ont montré que l'insuline, ajoutée in vitro, augmente l'incorporation d'aminoacides ou de leurs précurseurs marqués par ^{14}C, dans les protéines du diaphragme, en absence de glucose. Le même effet a été observé par Krahl sur le tissu adipeux isolé de l'épidydime de rat (61). Cette action de l'insuline n'est pas due à une pénétration accrue d'aminoacides ou de leurs précurseurs dans la cellule (62), et ce fait a été récemment confirmé par Manchester (63).

Parallèlement à ces résultats, Barrnett et Ball (64) ont montré que l'insuline provoquait, sur le tissu adipeux en survie, des modifications morphologiques indépendantes de la présence de glucose: pynocytose et prolifération du réticulum endoplasmique.

L'ensemble de ces résultats souvent contradictoires nous a conduits à examiner l'effet de l'insuline sur le tissu en survie d'un point de vue différent, en étudiant la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés. Une telle étude de la vitesse de renouvellement des phosphates labiles (phosphocréatine et ATP) avait déjà été entreprise il y a quelques années par Sacks et al. (65), qui avaient observé une stimulation de l'incorporation de ^{32}P dans ces fractions en présence d'insuline et de glucose. Mais Sacks n'avait pas déterminé séparément la pénétration du phosphate radioactif à l'intérieur des cellules et la vitesse de renouvellement des fractions labiles. De plus, les différents phosphates de l'ATP, les uridine et guanosine nucléotides n'avaient pas été séparés et l'action de l'insuline n'avait pas été étudiée en l'absence de glucose.

Il convenait donc de reprendre l'étude de ce problème d'une manière plus systématique à l'aide des méthodes de séparation plus spécifiques des différents composés phosphorylés qu'il est possible d'appliquer actuellement.

B - Hormone de croissance.

L'existence dans l'antéhypophyse d'une hormone stimulant la croissance avait été mise en évidence à la suite d'un certain nombre d'observations: anomalies de croissance chez l'homme, acromégalie, gigantéisme, provoquées par des tumeurs de l'hypophyse, retards ou arrêt de la croissance des jeunes animaux hypophysectomisés, troubles supprimés par traitement avec des extraits hypophysaires. L'hormone a été isolée et purifiée par Li et al. en 1945 puis, par Wilhelmi et al. en 1948 à partir de l'hypophyse de boeuf (66, 67).

L'hormone de croissance bovine agit sur la croissance du rat, de la souris et du chien, mais n'exerce aucune activité sur le métabolisme de l'homme. En 1956 et 1957, des hormones de croissance purifiées furent isolées de l'antéhypophyse du singe et de l'homme (68, 69). Les poids moléculaires de ces dernières hormones, respectivement 25.000 et 29.000, sont très différents de celui de l'hormone de croissance bovine (45.000). Il semble donc que cette hormone varie considérablement suivant les espèces considérées. Le mécanisme de son action sur la croissance est encore inconnu; cette action s'exerce sur tous les tissus d'animaux jeunes et s'accompagne d'effets sur le métabolisme des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

1 - Action de l'hormone de croissance sur le métabolisme des glucides.

Les effets provoqués par l'hormone de croissance sur le métabolisme des glucides sont très différents suivant la durée de l'action de cette hormone. L'effet immédiat de l'hormone de croissance est analogue à celui que provoquerait une petite dose d'insuline. Cette action peut être reproduite in vitro. Trois explications différentes ont été envisagées: la première explication possible consiste en une stimulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas, mais le fait que cette action subsiste in vitro (70) et chez l'animal alloxane-diabétique (71) semble écarter cette hypothèse. La seconde, une contamination de l'hormone de croissance par de faibles quantités d'insuline ne paraît pas théoriquement impossible étant

donné que les doses d'hormone de croissance employées chez l'animal sont 200 fois plus fortes (1 µg/g) que la dose active minimum d'insuline (0,005 µg/g). Il est cependant difficile d'admettre que les préparations d'hormone de croissance purifiée contiennent des traces d'insuline puisque l'hypophyse ne sécrète pas cette hormone. La troisième explication envisagée serait un effet protéique non spécifique de l'hormone de croissance, analogue à l'action de l'insuline, in vitro. Un tel effet "insulinique" non spécifique a été signalé pour de fortes doses d'ocytocine et de vasopressine. Quoi qu'il en soit, l'action prolongée d'injections d'hormone de croissance, chez l'animal hypophysectomisé, produit des effets très différents de ceux de l'insuline sur le métabolisme des glucides. Ces effets commencent à se manifester 4 à 6 heures après l'injection de l'hormone et se prolongent pendant 24 à 48 heures; si l'injection est répétée, ils continuent à se manifester pendant tout le temps du traitement. Il convient de signaler que cette action beaucoup plus nette que l'action pseudoinsulinique, obtenue immédiatement après l'injection, n'a jamais pu être reproduite in vitro sur des tissus isolés.

En l'absence d'antéhypophyse, l'animal est incapable de conserver ses hydrates de carbone. On observe une perte de glycogène hépatique et musculaire, ainsi qu'une hypersensibilité à l'action de l'insuline, provoquant une hypoglycémie surtout au cours du jeûne. Sur de tels animaux, l'action de l'hormone de croissance se résume en une élévation nette du taux de glucose sanguin (action diabétogène) et en une élévation du taux de glycogène hépatique et musculaire (action glycostatique). L'action diabétogène ou anti-insulinique de l'hormone de croissance, connue depuis les travaux de Houssay (72), a été décrite par de nombreux auteurs (73, 74, 75). L'action glycostatique de l'hormone de croissance est particulièrement nette en ce qui concerne le glycogène musculaire (76, 77).

De nombreux auteurs ont tenté d'établir une corrélation entre l'action diabétogène et glycostatique chez l'animal entier et le comportement in vitro de tissus d'animaux hypophysectomisés, après des injections d'hormone de croissance additionnée ou non de corticostéroïdes. Ainsi, Park et ses collaborateurs ont trouvé, en 1952, (78) une diminution de la consommation de glucose par le diaphragme isolé et ces résultats ont été confirmés depuis (70, 79). Une telle action de l'hormone de croissance s'accordait bien avec son effet diabétogène et suggérait une diminution générale de l'utilisation des glucides dans le métabolisme des tissus

périphériques. L'action glycostatique de l'hormone de croissance pouvait alors également trouver son explication dans la diminution de l'utilisation périphérique du glucose. Comme d'autre part, l'hormone de croissance stimule le catabolisme des acides gras, de nombreux auteurs ont conclu que cette hormone provoquait une réorientation du métabolisme énergétique aboutissant à une utilisation préférentielle des acides gras comme substrats de ce métabolisme. Il faut cependant noter que de très récents travaux de Park et al. (80) sur le coeur isolé et perfusé de rat ne permettent pas de mettre en évidence une inhibition significative de la consommation de glucose. En revanche, ces auteurs ont constaté l'inhibition de la phosphorylation du glucose sous l'influence de l'hormone de croissance, additionnée ou non de cortisone, ce qui aboutit à l'accumulation de glucose libre à l'intérieur des cellules, notamment en présence d'insuline.

Ces résultats s'accordent avec les données obtenues par les mêmes auteurs sur l'animal diabétique (50), chez lequel la phosphorylation du glucose dans les tissus périphériques est fortement diminuée, ce qui peut être attribué à une sécrétion endogène d'hormone de croissance et de corticostéroïdes dont l'effet n'est plus équilibré par l'insuline. L'hypophysectomie lève cette inhibition qui est rétablie par l'injection d'hormone de croissance et de cortisone.

L'ensemble de ces résultats montre bien que l'hormone de croissance et l'insuline exercent sur le métabolisme périphérique des glucides des effets antagonistes. Ceci nous a conduits à étudier l'influence de l'hormone de croissance sur les fractions phosphorylées du diaphragme isolé de rat en présence ou non d'insuline dans le milieu d'incubation.

2 - Action de l'hormone de croissance sur le métabolisme des lipides.

L'hormone de croissance exerce une action sur le métabolisme des lipides. Li, Simpson et Evans (81) avaient trouvé en effet que des rats hypophysectomisés accumulent plus de lipides que les mêmes animaux traités par l'hormone de croissance. Greenbaum (82) a montré que l'hormone de croissance abaissait chez l'animal entier le quotient respiratoire jusqu'à des valeurs voisines de 0,70 caractéristiques du catabolisme des acides gras. L'hormone de croissance provoque chez l'animal une mobilisation des graisses qui s'accumulent dans le foie où elles sont oxydées (83). Cette action de l'hormone de croissance a été étudiée in vivo et in vitro.

Il ne semble pas, à notre connaissance, que des expériences sur le métabolisme des acides gras aient été faites sur des tissus isolés d'animaux hypophysectomisés après injection d'hormone de croissance. En revanche, certains résultats expérimentaux ont été publiés en ce qui concerne l'addition d'hormone de croissance in vitro et son effet sur le métabolisme du tissu adipeux isolé. Ainsi, White et Engel (84) et Leboeuf et Cahill Jr. (85), ont montré que l'hormone de croissance stimulait la libération d'acides gras, ce qui s'accorde bien avec l'effet de cette hormone in vivo. D'autre part, Winegrad et al. (86) étudiant l'action de l'hormone de croissance, ajoutée in vitro, sur le tissu adipeux isolé de l'épidydime de rat, montrent que l'hormone de croissance ne provoque pas, comme l'insuline, une augmentation de la biosynthèse des acides gras et semble accélérer l'oxydation du glucose (notamment du carbone C-6). Ces derniers résultats semblent encore difficiles à interpréter, comme de nombreuses autres actions obtenues avec l'hormone de croissance in vitro.

3 - Action de l'hormone de croissance sur le métabolisme des protéines.

Un accroissement du protoplasme et de ses constituants est lié à une augmentation des réserves protéiques de l'organisme. Une action de l'hormone de croissance sur le métabolisme des protéines était donc prévisible.

L'hormone de croissance, administrée à un animal, provoque une rétention azotée (87, 88) et cette rétention est d'autant plus marquée que le régime est plus protéique. Un accroissement des réserves protéiques sous l'influence de l'hormone de croissance pouvait être dû à une diminution du catabolisme des protéines, à une augmentation de la synthèse protéique résultant d'une activation des enzymes intervenant dans cette synthèse, à une augmentation de la synthèse protéique provoquée par l'augmentation du pool des aminoacides dans la cellule, enfin à plusieurs de ces réactions à la fois.

L'hormone de croissance diminue le catabolisme des aminoacides comme cela a été montré par Hoberman en 1950 (89) et Bartlett en 1955 (90), mais elle augmente également le transport des aminoacides dans les tissus: Li et al. (91) et Milman et Russel (92) ont montré que l'hormone de croissance provoquait une disparition des aminoacides du plasma. Une action directe de l'hormone de croissance sur le transport des aminoacides a été démontrée, chez l'animal vivant, par Noall et al.(93) et par

Riggs et Walker (94) à l'aide d'aminoacides non métabolisables (acide α-aminoisobutyrique) dans différents tissus, coeur, muscle du squelette et foie. Cette action de l'hormone de croissance sur les aminoacides est liée à une activation de la synthèse protéique (95). La nature de cette activation n'a pas encore été déterminée.

4 - Action de l'hormone de croissance sur le métabolisme des acides nucléiques.

Chez le rat hypophysectomisé, on constate dans le foie une chute de l'ARN et des protéines du noyau et du cytoplasme, comme l'ont précisé di Stefano et al. (96) grâce à une étude au microscope électronique. L'hormone de croissance purifiée, injectée à cet animal, rétablit au bout de deux jours d'action les taux d'ARN et des protéines à leur niveau normal (97). L'hormone de croissance augmente à la fois la teneur de l'ARN lié aux microsomes et de l'ARN soluble (98). Pour di Stefano et al. (99), la synthèse, sous l'influence de l'hormone de croissance, d'ARN et de protéines dans le noyau, précèderait celle de ces mêmes constituants dans le cytoplasme (99). Cette constatation reste d'ailleurs controversée (100). L'hormone de croissance provoque également, dans le foie, une synthèse accrue d'ADN (101), lié à une augmentation des mitoses dans ce tissu (102).

L'ampleur des effets de l'hormone de croissance sur le métabolisme des acides nucléiques,que l'on ne constate dans le foie qu'après un délai de 12 à 24 heures reste cependant limitée.

III - ACTION DE L'OESTRADIOL SUR LE METABOLISME DU MUSCLE LISSE.

Contrairement à l'action de l'insuline sur le muscle strié du diaphragme, une action des hormones oestrogènes sur leur principal tissu récepteur, l'utérus, n'a jamais pu être mise en évidence par addition de préparations hormonales, in vitro, à des tissus en survie. L'action de cette hormone ne s'exerce d'ailleurs, in vivo, qu'après un temps d'induction qui varie de quelques heures à quelques jours suivant le phénomène étudié.

L'étude de l'action de l'oestradiol sur le taux et la vitesse de renouvellement des nucléotides libres de l'utérus n'a donc été entreprise, au cours du présent travail, qu'après des traitements suffisamment prolongés pour que les effets de l'oestradiol sur le tissu utérin soient déjà nettement visibles macroscopiquement

(6 à 48 heures). Il ne peut donc être question de relier ces effets au mécanisme primaire de l'action de cette hormone sur le tissu utérin,qui est encore contesté. Malgré cette impossibilité, les actions principales des oestrogènes sur le tissu utérin et les hypothèses émises, au cours de ces dernières années, sur le mécanisme de cette action seront brièvement résumées ci-dessous.

Les effets macroscopiques et histologiques de l'oestradiol sur l'utérus d'animaux ovariectomisés sont bien connus et ont donné lieu à de nombreuses revues d'ensemble (103, 104, 105, 106). Ils ne seront pas décrits en détail ici. On sait que l'utérus est essentiellement composé de deux tissus: le myomètre et l'endomètre, qui sont tous deux stimulés par l'oestradiol. Dans le myomètre, l'hypertrophie des cellules (107) n'est pas associée, du moins dans les premiers temps de l'action hormonale, à une mitose apparente (108, 109). Ce fait est confirmé par l'absence d'une augmentation du taux d'ADN dans l'utérus au cours des premières heures de l'action de l'oestradiol sur cet organe (110). En revanche, la stimulation des cellules myométriales s'accompagne d'une synthèse de protéines avec apparition parallèle de l'activité contractile.

Dans l'endomètre, on constate également une hypertrophie des cellules de l'épithélium et du stroma. Comme dans le myomètre, aucune activité mitotique n'est visible dans les premières heures d'action de l'oestradiol (111).

Au cours de l'action prolongée de l'oestradiol sur l'utérus d'un animal ovariectomisé, cet organe peut atteindre un poids de 5 à 10 fois supérieur à ce qu'il était avant le traitement. Une activité mitotique est visible, du moins dans les cellules épithéliales de l'endomètre, 24 heures après l'injection de l'hormone (112). De très nombreux chercheurs ont essayé d'établir quelle était, dans la suite de modifications qui provoquent cette stimulation générale des tissus de l'utérus, la réaction initiale responsable des divers effets de l'oestradiol.

Avant d'exposer les hypothèses envisagées pour expliquer cette action, il convient de résumer les principaux effets connus de l'oestradiol sur la perméabilité des cellules et le métabolisme.

A - Effets de l'oestradiol sur la perméabilité de l'utérus.

La croissance de l'utérus, au cours du cycle oestral ou sous l'influence d'injections d'oestradiol, est précédée par un afflux d'eau et d'électrolytes, aussi bien dans le myomètre que dans l'endomètre de ce tissu (113, 114). Ces phénomènes sont précédés par une hyperémie et une augmentation de la perméabilité des capillaires. Hechter et al. (115), Spaziani et Szego (116) ont montré dès les premières heures (1 à 2 heures) après l'injection d'oestradiol au rat impubère, une augmentation du Na, liée à l'augmentation d'eau dans le tissu utérin, sans modification du taux en potassium. Cette action de l'oestradiol présente un intérêt particulier du fait que ce sont les premiers effets de cette hormone, décelables in vivo, après son injection: le temps nécessaire pour qu'ils se manifestent est de 2 à 3 heures (117). Cette action relativement rapide de l'oestradiol est antagonisée par la cortisone (117). De récents travaux l'ont attribuée à une libération endogène d'histamine dans le tissu récepteur (118, 119, 112). L'action rapide de l'oestradiol sur le mouvement de l'eau et des électrolytes dans l'utérus pourrait éventuellement être liée à une stimulation du métabolisme, si cette action s'accompagnait d'une augmentation de la vitesse de pénétration et de l'accumulation de différents métabolites dans ce muscle, par un mécanisme analogue à celui qui a été envisagé pour l'insuline. Plusieurs travaux ont porté sur cette question. Les résultats obtenus sont cependant contradictoires: ainsi, Hechter et al. (120) et Halkerston et al. (121) ne trouvent pas d'accumulation de sucres non métabolisables (D-xylose) et d'acides aminés non métabolisables (acide α-aminoisobutyrique) dans l'utérus 90 minutes après injection d'oestradiol, alors qu'une augmentation de l'espace extracellulaire de ce muscle (mesuré par l'inuline) est déjà décelable à ce moment. En revanche, Noall et Allen (122) trouvent une accumulation d'acide α-aminoisobutyrique, 30 minutes après injection d'oestradiol, l'espace extracellulaire (déterminé par le saccharose) ne variant pas au cours de cette période. Cette contradiction paraît évidemment due aux différences dans la détermination de l'espace extracellulaire. Cet espace semble extrêmement difficile à mesurer dans l'utérus et les résultats obtenus par différents groupes de chercheurs sont totalement discordants.

B - Effets de l'oestradiol sur le métabolisme de l'utérus in vivo.

1- Métabolisme des sucres et des lipides.

De nombreux travaux sur le rat (123-128) et sur le lapin (129) montrent une augmentation de la consommation d'oxygène (Q_{O_2}) de 75%, 10 à 20 heures après l'injection de l'hormone et, une stimulation de la glycolyse aérobie ou anaérobie (+ 200%) 5 heures après injection d'oestradiol (125).

a) Glycogène: les injections prolongées d'oestradiol augmentent le taux de glycogène de l'animal ovariectomisé (130, 131, 132).

b) Lipides: l'effet le plus rapide observé, après injection d'oestradiol, sur le métabolisme des lipides, concerne l'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides (133). Cet effet peut d'ailleurs être mis en évidence par addition de l'hormone à du tissu utérin in vitro. Entre 6 heures et 20 heures après l'action de l'oestradiol, on a observé une augmentation de l'incorporation d'acétate ^{14}C dans les acides gras et le cholestérol, ainsi qu'une augmentation de l'incorporation des composés en C-1 (provenant soit du formiate, soit de la glycine) dans les lipides totaux (134, 135). Le taux des lipides par rapport au poids du tissu semble rester constant au cours de la croissance de l'utérus sous l'action de l'oestradiol.(136).

2- Biosynthèse des protéines.

La biosynthèse particulièrement active des protéines dans le tissu utérin stimulé par l'oestradiol et le mécanisme de son induction est évidemment l'un des problèmes les plus importants dans l'étude de l'action de cette hormone.

L'augmentation du taux de certaines protéines spécifiques, caractéristiques d'un tissu musculaire, telles que l'actomyosine, a été étudiée dès 1953, par Corner et Csapo (137). Des études analogues ont été faites sur d'autres enzymes ou protéines spécifiques, tels que les enzymes qui catalysent le transport d'hydrogène du DPNH à différents accepteurs: cytochrome c (138), chlorure de néotétrazolium (138), 2,4-dichlorophénol (139), peroxydes (140), ainsi que sur d'autres enzymes de la chaîne respiratoire comme la succinoxydase et la lacticodéshydrogénase (141, 142), et enfin, sur des enzymes comme la phosphatase alcaline (136) et la β-glucuronidase (143, 144). La biosynthèse de protéines de soutien comme le collagène (145) est également augmentée par l'oestradiol. Les travaux sur la stimulation de la biosynthèse de ces protéines sont trop nombreux pour être tous énumérés ici, des revues récentes (104-146)

ont été publiées à ce sujet.

Deux systèmes enzymatiques stimulés par l'oestradiol doivent cependant être mentionnés en détail. Le premier est la TPNH-DPN-transhydrogénase, dont il sera parlé plus loin. L'autre est constitué par les enzymes activant les acides aminés avec formation d'aminoacyladénylates, et qui a été étudié dans l'utérus par Mueller et al. (147). Ces auteurs ont d'abord étudié l'incorporation d'aminoacides marqués par ^{14}C dans les protéines de l'utérus in vivo (148) et constaté une augmentation, sous l'influence de l'oestradiol, correspondant à la synthèse protéique qui accompagne la croissance de ce muscle sous l'influence de cette hormone. Comme la première étape de la synthèse protéique est une activation des acides aminés par l'ATP à l'état d'adénylates d'acides aminés (4), Mueller et al.(147) ont étudié l'effet de traitements in vivo par l'oestradiol sur les enzymes activateurs d'acides aminés de l'utérus. Ils ont trouvé une augmentation du taux des enzymes activant spécifiquement 7 amino-acides distincts. Cet effet se produit au cours des 6 premières heures s'écoulant après le traitement, c'est-à-dire,à un moment, où il n'y a encore aucune synthèse de protéine et d'accumulation d'ARN mesurable. Plus récemment encore, Mueller et al.(149) ont établi que des injections de puromycine, antibiotique qui inhibe la biosynthèse des protéines (150) par les systèmes enzymatiques des animaux supérieurs, inhibait entièrement, chez le rat, non seulement la croissance de l'utérus sous l'action de l'oestradiol, mais encore les effets de cette hormone qui s'exercent antérieurement à cette croissance, et notamment les mouvements de l'eau et des électrolytes dont il a été parlé plus haut. Ces auteurs, ont donc émis l'hypothèse que l'action primaire de l'oestradiol pouvait porter sur la biosynthèse d'une ou plusieurs protéines spécifiques dont la quantité pouvait être suffisamment faible pour échapper à une mesure directe des protéines synthétisées. Ce point de vue sera discuté plus loin.

3- Biosynthèse des acides nucléiques.

a) Biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques: la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques, dans l'utérus de rat, sous l'influence de l'oestradiol, a été étudiée par Mueller et al. (151). L'incorporation de précurseurs marqués par ^{14}C (formiate, glycine, CO_2 et acide orotique), dans les nucléotides libres du tissu utérin, fait apparaître une différence importante entre les nucléotides puriques et les nucléotides pyrimidiques: en effet, dans l'utérus incubé en présence de précurseurs marqués par ^{14}C, la radioactivité spécifique des nucléotides puriques et

notamment des nucléotides adényliques, est augmentée si l'animal a subi un traitement préalable à l'oestradiol pendant un laps de temps aussi court qu'une heure. La radioactivité spécifique des nucléotides uridyliques n'est pas augmentée, même après un traitement de 6 heures, alors qu'en revanche, la quantité totale de ces nucléotides augmente de près de 200%. L'interprétation donnée par ces auteurs est fondée sur l'hypothèse d'une hydrolyse enzymatique limitée d'ARN chez l'animal ovariectomisé, au cours des premières heures de l'action de l'oestradiol. Les mononucléotides non radioactifs, formés au cours de cette hydrolyse, viendraient diluer le pool des nucléotides libres formés par biosynthèse du noyau purique et pyrimidique. Cette dilution serait plus sensible dans le cas des uridines dont le taux, dans l'utérus de l'animal ovariectomisé, est très faible, que dans le cas des adénines dont le taux, dans l'utérus des animaux témoins, est environ 10 fois plus fort que celui des uridines. Cette interprétation sera discutée au cours du présent travail.

b) Biosynthèse des acides nucléiques: la cinétique de la biosynthèse de l'ARN et de l'ADN a été étudiée par Mueller et al. (110). Ces auteurs ont constaté que la biosynthèse de l'ARN se produisait bien avant celle de l'ADN (6 à 24 heures après l'injection d'oestradiol au lieu de 40 à 72 heures après l'injection d'oestradiol). Ce fait est donc en accord avec les observations histologiques mentionnées plus haut, suivant lesquelles l'hypertrophie des cellules de l'utérus pouvait être observée bien avant l'hyperplasie et l'activité mitotique.

C- Effets in vitro de l'oestradiol.

1- Action in vitro de l'oestradiol sur l'utérus en survie.

Aucune action nette des oestrogènes sur l'utérus isolé, in vitro, n'a pu semble-t-il être démontrée jusqu'à ce jour (152, 123, 153). Le seul effet net constaté, in vitro, sur les organes en survie, est l'augmentation de l'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides de coupes d'utérus de rat (135) et l'augmentation de l'incorporation de ^{14}C acétate dans les acides gras, les protéines et le CO_2 respiratoire de coupes de placenta humain (154). La première de ces actions s'exerce pour des concentrations en oestrogènes ($10^{-8}M$) voisines ou légèrement supérieures au seuil d'action physiologique. La seconde, s'exerce pour des concentrations très supérieures ($10^{-6}M$) au seuil d'action physiologique de l'oestradiol.

2- Action de l'oestradiol sur les transhydrogénases du placenta et de l'endomètre.

Villee et al. ont démontré en 1953, une stimulation de la consommation d'oxygène par l'oestradiol à des concentrations physiologiques sur d'autres tissus que le myomètre: coupe d'endomètre et de placenta humain (155, 156). Cette stimulation a été retrouvée sur des homogénats de placenta et il a été démontré que l'action de l'oestradiol s'exerçait spécifiquement sur l'isocitricodéshydrogénase (157). Le mécanisme de cette stimulation a été, en grande partie du moins, élucidé par Villee et al. ainsi que par Talalay et al. (158, 159) qui ont démontré que ce n'était pas l'isocitricodéshydrogénase elle-même qui était stimulée, mais que la stimulation par les oestrogènes s'exerçait sur la réoxydation du TPNH par le DPN, le TPN formé étant l'accepteur d'électrons spécifique de l'isocitricodéshydrogénase. Cette action de l'oestradiol sur la réaction: DPN + TPNH $\rightleftharpoons$ DPNH + TPN, semble directe et s'exerce pour des concentrations physiologiques de cette hormone avec un système enzymatique partiellement purifié. Suivant Talalay et al., la transhydrogénase isolée à partir du placenta humain serait identique aux oestradiol déshydrogénases décrites par Langer et Engel (160) et par Langer, Alexander et Engel (161). Ces deux oestradiol déshydrogénases sont respectivement spécifiques du TPN et du DPN comme accepteurs d'hydrogène (162). La somme des réactions catalysées par ces deux enzymes pourrait donc s'écrire:

Déshydrogénase I $\quad$ oestradiol + DPN $\rightleftharpoons$ oestrone + DPNH + H^+

Déshydrogénase II $\quad$ oestrone + H^+ + TPNH $\rightleftharpoons$ TPN + oestradiol

---

DPN + TPNH + H^+ $\rightleftharpoons$ TPN + DPNH + H^+

Villee et al. (163) ont cependant réussi à séparer par électrophorèse continue sur papier les deux oestradiol déshydrogénases de la transhydrogénase proprement dite, dans des extraits de placenta. Ils ont montré que la transhydrogénase restait sensible à l'action activante de l'oestradiol, même en l'absence des oestradiol déshydrogénases. Ces auteurs ont donc émis l'hypothèse d'une activation directe de la transhydrogénase par l'oestradiol ou l'oestrone. Si l'activation directe de la transhydrogénase constituait le mécanisme primaire de l'action des oestrogènes, cette stimulation pourrait s'exercer sur tout le métabolisme énergétique en accélérant d'une part, la réoxydation du TPNH, dans le cas où la quantité de TPN serait limitante pour l'une des réactions où il joue le rôle d'accepteur d'hydrogène spécifique, et en augmentant

d'autre part, le rapport P/O des phosphorylations oxydatives qui est plus élevé pour l'oxydation du DPNH que pour l'oxydation directe du TPNH, comme l'ont montré Kaplan et al. (164). De plus, Hosoya, Hagerman et Villee (165) ont récemment montré que l'oestradiol pouvait accélérer la réaction inverse (réduction de TPN en TPNH couplée à une oxydation de DPNH en DPN, catalysée par le même enzyme) et que le TPNH formé pouvait intervenir spécifiquement dans la biosynthèse réductive des acides gras à longue chaîne.

D - Mécanisme d'action.

Les trois hypothèses envisagées pour expliquer l'action de l'oestradiol sur le tissu utérin sont donc:

1- l'augmentation des phénomènes de perméabilité cellulaire liée à une pénétration accrue de sucres et d'acides aminés, comme cela a été envisagé d'autre part pour l'insuline (116).

2- une biosynthèse induite de certains enzymes spécifiques (106, 149).

3- une action directe, en tant que coenzyme de la transhydrogénase (158, 159).

Il semble difficile à l'heure actuelle de donner la préférence à l'une ou à l'autre de ces hypothèses, ou encore d'établir entre elles une quelconque corrélation. L'action de l'oestradiol sur la perméabilité est, de toutes, celle qui est le plus rapidement décelable in vivo. Elle est cependant inhibée par l'injection de puromycine, ce qui indique qu'elle est précédée par une biosynthèse, même limitée, de protéines, alors qu'une biosynthèse nette de protéines ne peut être mise en évidence que bien plus tard.

Toutefois, ces deux hypothèses ne s'excluent pas entièrement, dans la mesure où l'on se souvient que l'insuline, elle aussi, semble provoquer simultanément une modification de la perméabilité et une biosynthèse de protéines. Un mécanisme commun pour ces deux actions pourrait être trouvé dans une transformation de ce que Peters appelle le "cytosquelette", par l'intermédiaire d'une réaction spécifique entre l'insuline et une protéine à -SH de la membrane (51). Il est tentant d'envisager un mécanisme analogue pour l'action de l'oestradiol, sur le tissu utérin.

La troisième hypothèse qui fait intervenir l'oestradiol, à la manière d'un coenzyme, dans une réaction enzymatique spécifique catalysée par la transhydrogénase,

est difficilement conciliable avec les hypothèses précédentes. A première vue, le fait qu'elle puisse être démontrée in vitro et qu'elle ait lieu pour des concentrations physiologiques d'hormones, le fait aussi, qu'elle pourrait expliquer l'accélération générale du métabolisme par la suppression d'un "goulot d'étranglement", doivent être retenus en sa faveur. Cependant, ce système enzymatique n'a pu être mis en évidence dans l'utérus (166), qui est le tissu le plus sensible à l'action des oestrogènes et dont le métabolisme énergétique (Q_{O_2}, incorporation d'acétate dans les acides gras, etc...) n'est pas stimulé in vitro par l'addition d'oestradiol. Il faut également mentionner le travail de Stein et Kaplan (167), qui ont montré que dans le foie la transhydrogénase soluble ne comprenait qu'à peine 1% de la transhydrogénase totale et conclu que "les α-hydroxystéroïdes déshydrogénases ne peuvent pas participer d'une manière significative aux réactions catalysées par la transhydrogénase dans les tissus animaux". Enfin, la puromycine qui inhibe totalement tous les effets de l'oestradiol chez l'animal vivant, est sans action sur la transhydrogénase (166).

Malgré les progrès accomplis au cours des dernières années et qui ont permis de trouver des actions de plus en plus proches, sans doute, du mécanisme d'action primaire des hormones oestrogènes, rien ne permet de dire, à l'heure actuelle, que ce mécanisme soit connu.

MATERIEL ET METHODES

I - PRODUITS.

1 - Hormones.

- Oestradiol sous forme de benzoate d'oestradiol (Benzogynoestryl "1") des Laboratoires Roussel;
- Progestérone cristallisée (Lutogyl "25") des Laboratoires Roussel;
- Hormone de croissance antéhypophysaire de boeuf: nous avons utilisé un lot d'une hormone électrophorétiquement et biologiquement pure (168) mis à notre disposition par le Professeur C.H. Li;
- Insuline cristallisée de boeuf des Laboratoires de l'Endopancrine titrant 25,9 Unités Internationales par mg et contenant environ 0,2% de zinc;
- Insuline amorphe des Laboratoires de l'Endopancrine titrant approximativement 22 Unités Internationales par mg et totalement dépourvue de zinc;
- Ocytocine obtenue par la méthode de Maier-Hüser et al. (169) titrant 125 Unités Internationales par mg.

2 - Nucléotides.

- Adénosine mono-, di- et triphosphate
- diphosphopyridine nucléotide
- Triphosphopyridine nucléotide

  provenant de la California Foundation for Biochemical Research.
- Guanosine mono-, di- et triphosphate
- Cytidine mono-, di- et triphosphate
- Uridine mono-, di- et triphosphate
- Uridine diphosphoglucose

  provenant des Etablissements Sigma Chem. C°.

3 - Phosphate radioactif.

Il est utilisé sous forme d'une solution de $NaH_2{}^{32}PO_4$, d'une activité de 2 à 5 mc/ml, fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique. On utilise cette solution après une hydrolyse en présence de HCl normal, pendant 15 minutes, au bain-

marie bouillant afin d'éliminer le pyrophosphate éventuellement présent. Puis, on neutralise avec 9 volumes d'une solution normale de $NaHCO_3$ afin d'obtenir une concentration finale en NaCl de 9 g par litre.

4 - Réactifs et substrats.

- Les réactifs utilisés sont des produits pour usage analytique.
  L'eau est bidistillée dans des appareils en verre.
  Le charbon actif utilisé pour adsorber les nucléotides a été le Norit SX-30 spécial ou le Norit SX-11 (N.V. Norit, Amsterdam).
  L'isobutanol est purifié par deux distillations (l'une sur CaO, l'autre sur H_3PO_4) d'un produit commercial.
- Les substrats utilisés sont:
  le D-glucose des Etablissements Hoffman la Roche, Paris,
  le Na-β-hydroxybutyrate des Etablissements Serlabo, Paris.

II - ANIMAUX ET TRAITEMENTS.

1- On utilise des rats de souche Wistar; suivant les cas, les animaux sont mis à jeun, 10 à 18 heures avant le sacrifice. Les animaux sont pesés et seuls les animaux de poids voisins sont conservés pour les expériences.

Rats ovariectomisés.

L'ovariectomie est pratiquée par voie dorso-lombaire sur des animaux adultes ou impubères, anesthésiés à l'éther. Les rats sont utilisés 4 à 5 semaines après l'intervention. L'examen du site ovarien ainsi que l'atrophie de l'utérus permettent de vérifier que l'ovariectomie est bien complète.

Rats hypophysectomisés.

L'hypophysectomie est pratiquée par voie latérolaryngée. Les rats sont utilisés 15 jours à 6 semaines après l'opération. Les rats utilisés au cours de la même expérience ont été opérés à la même date. L'hypophysectomie est contrôlée par examen de la selle turcique afin d'éliminer les animaux imparfaitement opérés.

2- Les traitements.

L'oestradiol et la progestérone sont injectés par voie sous-cutanée dorsale en solution dans l'huile végétale neutralisée.

- L'oestradiol a été utilisé soit à la dose de 10 µg, 48 heures et 24 heures avant le sacrifice, soit à la dose de 25 µg pendant 3 jours consécutifs.

Les rats traités simultanément à l'oestradiol et à la progestérone l'ont été soit aux doses de 10 µg d'oestradiol et 100 µg de progestérone 48 et 24 heures avant le sacrifice, soit aux doses de 25 µg d'oestradiol et 5.000 µg de progestérone pendant 3 jours consécutifs.

- L'hormone de croissance antéhypophysaire est injectée sous forme d'une solution dans $NaHCO_3$ 1,3% contenant 500 µg d'hormone par ml. On pratique selon les cas, une ou deux injections de 250 µg par voie sous-cutanée dorsale 30 et 20 heures avant le sacrifice de l'animal.

- La solution de phosphate radioactif est injectée dans la veine de la queue d'animaux anesthésiés. Afin de faciliter l'injection, on maintient préalablement la queue du rat 5 minutes dans l'eau à 40°. La dose utilisée est d'environ 0,1 mc par 100 g de poids d'animal.

III - PREPARATION DE L'EXTRAIT TRICHLORACETIQUE DE MUSCLE.

1- Dissection et congélation.

Les animaux sont tués par décapitation. L'utérus ou le diaphragme sont immédiatement prélevés, puis disséqués sur une tablette refroidie à 0°. Dans le cas du diaphragme, seule la partie latérale de ce muscle est utilisée pour l'expérience. Les organes sont ensuite, selon les cas, introduits dans une fiole à glycolyse d'un appareil de Warburg pour les expériences in vitro, immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis pesés le plus rapidement possible afin d'éviter tout réchauffement de l'organe, ou maintenus à 0° et pesés en prenant les mêmes précautions que précédemment.

2- Homogénéisation.

Les organes maintenus à 0° ou congelés ont été homogénéisés en présence d'acide trichloracétique à 5 ou à 10% soit grâce à des broyeurs de verre rôdés, refroidis extérieurement (du type Potter-Elvehjem), soit à l'aide d'un homogénéiseur Virtis "45" composé d'une lame d'acier tournant à une vitesse de 45.000 tours/minute.

L'homogénat est centrifugé 20 minutes à 18.000 g à 0°. Les dosages sont effectués sur le liquide surnageant.

IV - FRACTIONNEMENT ET DOSAGE DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DE L'EXTRAIT TRICHLORACETIQUE.

A - Aperçu général.

L'extrait trichloracétique du muscle contient essentiellement le phosphate minéral et les esters phosphoriques de faible poids moléculaire tels que la phosphocréatine, les mononucléotides adényliques, guanyliques et uridyliques et les intermédiaires phosphorylés du métabolisme du glucose. De nombreuses méthodes permettent de les séparer plus ou moins spécifiquement.

1- Méthodes peu spécifiques.

a) Le fractionnement des composés organiques du phosphore par précipitation à l'aide de sels métalliques, en particulier le baryum, en faisant varier le pH et la concentration en éthanol (170);

b) Le fractionnement des phosphates suivant leur vitesse d'hydrolyse (171). Cette technique a été utilisée au cours du présent travail.

2- Méthodes spécifiques.

a) Techniques enzymatiques:

Le traitement de l'extrait de tissu par un enzyme spécifique peut aboutir soit à la libération de phosphate provenant d'un composé donné, soit à son transfert sur un composé qui lui, est ensuite isolé et analysé. Tel est le principe de la méthode de Kalckar (172) (qui utilise la myosine, la myokinase et l'hexokinase) et de la méthode de Hers et al. (173).

Une autre méthode enzymatique utilisé pour le dosage spécifique de l'ATP est la mesure de la luminescence de l'extrait de Photinus pyralis. Cette technique a été utilisée au cours du présent travail.

b) Séparation par ionophorèse et chromatographie:

- Ionophorèse: il faut citer la méthode de Markham et Smith (174); les nucléotides sont séparés sur papier grâce à un fort voltage appliqué pendant un temps court (1.000 v pendant 2 heures).

Il faut également citer la méthode de Heald (175) qui combine le fractionnement par précipitation au baryum et l'électrophorèse, ainsi que celle de Wade et Morgan (176) qui combinent une électrophorèse à des séparations chromatographiques sur papier.

- Chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions: diverses résines échangeuses d'anions, fortement basiques, ont été utilisées:

  Dowex 1, Dowex 2 ou Dowex 1 X 2 par Cohn (177)

  Amberlite IRA-400 par Cohn et Carter (178)

  Divers auteurs, Bergvist et Deutsch (179), Hurlbert et al. (34), Schmitz, Potter, Hurlbert et al. (180), Khim et Cohn (181) éluent les différents composés phosphorylés par un gradient d'élution, en particulier sur Dowex 1, (acide formique ou l'acide formique plus formiate d'ammonium. Des perfectionnements à ces techniques ont été apportés par Schmitz et al. (182) qui utilisent Dowex 2 et par Bartlett (183) qui utilise la résine Dowex 1 sous forme de chlorure ou de formiate d'ammonium.

- Chromatographie des nucléotides sur papier: la technique que nous avons utilisée dérive de celle de Threlfall (184). Elle comprend une adsorption des nucléotides sur charbon actif qui avait déjà été employée par Crane et Lipmann (185) pour l'adsorption des nucléotides par addition de charbon "en masse" aux solutions qui les contenaient. Les nucléotides retenus sur le charbon sont élués, puis chromatographiés sur papier. Ils seront ainsi séparés et dosés. La chromatographie est pratiquée, selon les cas, dans une ou deux directions.

B - Méthodes employées au cours du présent travail.

1 - Dosage des phosphates.

Les méthodes de dosage des phosphates utilisées au cours de ce travail sont au nombre de quatre. Elles sont toutes basées sur la formation du complexe phosphomolybdique qui donne par réduction un composé de couleur bleue dosé colorimétriquement au spectrophotomètre Coleman Jr. à 680 mμ.

a) Méthode de Lowry et Lopez (186):

Cette méthode permet de doser le phosphate minéral de l'extrait en présence des esters très labiles. Elle tient compte du fait que dans une zone de pH comprise entre pH 2,8 et pH 4,5, les esters phosphorylés très labiles sont relativement stables et que l'on peut suivre leur vitesse d'hydrolyse dans le temps. Le complexe phosphomolybdique formé par le phosphate minéral de l'extrait et le phosphate libéré par hydrolyse est réduit grâce à l'acide ascorbique qui ne provoque qu'une faible hydrolyse des composés labiles. Le mode opératoire est le suivant:

- un volume de l'extrait trichloracétique est additionné de 4 volumes d'acétate de sodium 0,1 M, ce qui conduit à un pH de 3,9-4,1. Ensuite on met dans l'ordre: 1,3 ml de mélange de pH 4,0 (soit 1 volume d'acide trichloracétique à 5% + 4 volumes d'acétate de sodium 0,1 M);

  0,2 ml de molybdate d'ammonium à 1% dans H_2SO_4 0,05 N;

  0,7 ml de prise d'essai;

  0,2 ml d'une solution fraîchement préparée d'acide ascorbique à 1%.

  On suit le développement de la coloration à l'électrophotomètre. On fait des lectures 10 et 20 minutes après addition de l'acide ascorbique. On calcule le phosphate minéral de l'extrait par extrapolation au temps zéro. Dans tous les cas, on vérifie les réactifs grâce à des essais témoins et l'absence d'inhibiteurs grâce à des standards internes. Ces dosages ainsi que ceux de la gamme standard sont faits parallèlement et dans les mêmes conditions que ceux des essais réels.

b) Méthode de Fiske et Subbarow (187, 188):

Le phosphate est transformé en acide phosphomolybdique dans l'acide sulfurique 0,5 M. On met dans l'ordre: 0,7 ml de prise d'essai;

0,2 ml de H_2SO_4 10 N;

0,4 ml de molybdate d'ammonium 2,5 %;

Au bout de 15 à 20 minutes, temps nécessaire à l'hydrolyse complète des esters très labiles, on ajoute 0,2 ml de réactif réducteur de Fiske et Subbarow et 1,5 ml d'eau distillée. On laisse la coloration se développer à 38° et on fait les lectures au spectrophotomètre. Des standards internes et la gamme standard sont préparés en même temps et dans les mêmes conditions que les essais réels. Nous avons utilisé pour la préparation du réducteur du Rhodol ou sulfate de monométhyl-p-aminophénol (Prolabo).

c) Méthode de Berenblum et Chain (189):

Dans cette méthode, le complexe phosphomolybdique formé est extrait par l'isobutanol ce qui permet d'éliminer les impuretés et les inhibiteurs éventuellement contenus dans l'extrait.

Dans une ampoule à décantation de 25 ml, on met 2,5 ml de solution aqueuse de molybdate d'ammonium à 2,5 % et 8 ml d'isobutanol redistillé. On transfère la

prise d'essai en rinçant le matras qui a servi à la minéralisation avec 7 ml d'eau distillée. L'acide sulfurique employé pour la minéralisation suffit à amener le pH à 0,9-1,1, valeur utilisée pour le dosage. Si l'on opère avec une solution standard de phosphate ou une solution insuffisamment acide, on ajoute dans l'ampoule 0,3 ml d'acide sulfurique concentré. On extrait l'acide phosphomolybdique en agitant les ampoules 30 secondes, puis on élimine la couche inférieure. On lave deux fois avec 5 ml d'acide sulfurique normal, pendant 15 secondes, puis on transfère la phase isobutanolique dans un tube gradué en rinçant l'ampoule avec de l'éthanol à 95%; on ajuste à 10 ml avec de l'éthanol. Au moment du dosage, on réduit avec 0,1 ml d'une solution de $SnCl_2$ (10 g $SnCl_2$ dans 25 ml HCl concentré), on agite et on lit au colorimètre.
Un blanc réactif et une gamme standard sont faits dans les mêmes conditions.

d) Méthode de Zeller (190):

Cette méthode est une modification de la méthode de Berenblum et Chain. Le complexe phosphomolybdique est extrait par l'isobutanol à un pH voisin de 1. On met dans l'ordre dans une burette: 0,7 ml de prise d'essai, puis 4 gouttes de H_2SO_4 10 N, 0,5 ml de molybdate d'ammonium 2,5 % et 1 ml d'isobutanol. On agite le mélange grâce à un courant gazeux pendant 1 minute. On sépare la couche organique qui contient le complexe phosphomolybdique de la couche aqueuse par décantation de cette dernière. On lave deux fois la couche organique avec 1 ml de H_2SO_4 N, on agite avec un courant d'air, on élimine chaque fois la couche aqueuse par décantation. On ajoute finalement 0,7 ml d'une solution chlorhydrique de $SnCl_2$ préparée extemporanément par dilution de 1 ml d'une solution mère (contenant 10 g de $SnCl_2$ dans 25 ml de HCl concentré), puis 1 ml d'alcool éthylique à 95%; on ajuste le volume final à 5 ml avec H_2SO_4 N. On fait des lectures à 680 mμ. Les gammes standards sont préparées dans les mêmes conditions que les essais réels.

Les trois dernières méthodes, qui ne permettent pas de distinguer le phosphate minéral des esters phosphoriques très labiles comme la phosphocréatine, ont donné des résultats concordants dans tous les cas où elles ont été utilisées simultanément.

2 - Détermination des phosphates suivant leur vitesse d'hydrolyse.

Nous avons séparé les phosphates acidosolubles d'après leur vitesse d'hydrolyse en milieu acide. Nous dosons ainsi:

- l'orthophosphate réel du tissu: on peut le distinguer des esters phosphorylés très labiles comme la phosphocréatine, l'acétylphosphate .... par la méthode de Lowry et Lopez (186);
- le phosphate "0-minute" qui est la somme du phosphate minéral réel et des esters phosphorylés très labiles. On le détermine par un dosage de phosphate en milieu acide sur l'extrait de tissu maintenu à 0°.
- le phosphate "7-minutes": c'est le phosphate libéré après une hydrolyse en tube scellé de l'extrait de tissu pendant 7 minutes à 100°, en présence d'HCl N. Le phosphate provient des composés suivants: pyrophosphate, métaphosphate, phosphates labiles des nucléotides (non liés au ribose), intermédiaires de la glycolyse tels que glucose-1-phosphate, phosphoglycéraldéhyde, phosphodihydroxyacétone, phosphoénolpyruvate, phosphate en position 1 de l'acide diphospho-1,3-glycérique. Etant données les quantités de ces différentes substances existant dans le muscle, l'essentiel de cette fraction provient de l'hydrolyse des liaisons riches en énergie des nucléotides di- et triphosphates.
  Le phosphate 7-minutes est calculé par différence entre le phosphate dosé après hydrolyse et le phosphate 0-minute.
- phosphate non hydrolysable en 7-minutes: c'est le phosphate des esters phosphoriques tels que: glucose-6-phosphate, ribose-5-phosphate, glycérophosphate, adénosine,uridine ou guanosine-5'-phosphate. Ces esters ne sont pas hydrolysés après traitement de l'extrait trichloracétique pendant 7 minutes, à 100°, en présence d'HCl N.

3 - Fractionnement des nucléotides libres par chromatographie.

Le surnageant obtenu après centrifugation est traité 4 fois, chaque fois avec un volume égal d'éther froid afin d'éliminer l'acide trichloracétique,ce qui est indispensable pour assurer une adsorption quantitative des nucléotides sur le charbon. On élimine la couche supérieure éthérée et après la dernière extraction on évapore l'excès d'éther grâce à un courant gazeux pendant 10 minutes, l'extrait étant maintenu à 0°.

a) Adsorption et élution sur colonne:

Les colonnes de verre utilisées comprennent une partie large de 10 mm de diamètre et une partie étroite de 4 mm de diamètre. Le mélange adsorbant est composé de:

- 50% de charbon Norit S X 30 spécial ou S X 11 et de 50 % Hyflo-supercel lavé, traité avec HCl N ou 2 N, rincé à l'eau distillée et séché à l'étuve vers 100 à 150°.

On utilise 250 mg du mélange adsorbant et on lave en faisant passer sur la colonne 2 ml d'une solution de versène à 2% (acide éthylène diaminetétracétique neutralisé avec NH_4OH N) pour éliminer les cations divalents qui se combinent aux nucléosides polyphosphates provoquant leur adsorption partiellement irréversible. On désactive (en partie) le mélange adsorbant par passage de 5 ml d'une solution d'octanol secondaire à 8% dans l'éthanol. Après passage d'un volume connu de l'extrait (contenant 200 à 400 µg de nucléotides) on lave la colonne avec de l'eau distillée.

Sont retenues: les bases, nucléosides et nucléotides, y compris le DPN et le TPN.

Passent: glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, esters phosphoriques, pyrophosphate et phosphate minéral.

On élue les nucléotides par 5 ml de pyridine 50%.

Toutes ces opérations se font sous pression de 0,5 atmosphère. L'éluat est évaporé à sec sous courant d'air froid, puis repris par un volume connu de pyridine 20% et chromatographié sur papier.

b) Chromatographie sur papier:

On utilise du papier Whatman n°1. On lave les feuilles au préalable avec une solution de versène à 2% neutralisée avec NH_4OH N. On laisse en contact 6 heures puis on lave 6 fois à l'eau distillée. On fait sécher le papier sur une surface polie et propre. Ce lavage a pour but de débarrasser le papier de ses cations divalents qui nuiraient à la bonne séparation chromatographique des nucléotides. Ceux-ci, en solution dans la pyridine à 20%, sont déposés sur le papier à l'aide d'une seringue Agla (Burrough's Wellcome Ltd., Londres) munie d'une vis micrométrique. On utilise dans la première direction le solvant indiqué par Krebs et Hems (191):

Acide isobutyrique 10 volumes

NH_4OH N 6 volumes

La durée du cheminement est d'environ 20 heures. Après avoir séché le chromatogramme, on localise les nucléotides avec une lampe à rayons ultraviolets courts

(253,8 mμ): ils se détachent en sombre sur la fluorescence du papier. On les cercle au crayon. Les Rf relatifs mesurés par rapport à celui de l'AMP sont les suivants:

ADP 0,82; ATP 0,65; UDP 0,40; UTP 0,27; GMP 0,54; GDP 0,41; GTP 0,27; IMP 0,57; DPN 0,87; TPN 0,58; CDP 0,62; CTP 0,46.

Les adénosine nucléotides, l'IMP et le DPN sont donc nettement séparés. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune quantité mesurable de cytidine nucléotides aussi bien dans l'utérus que dans le diaphragme au cours de ce travail.

Pour étudier les uridine et guanosine phosphates, on élue les taches de Rf 0,25 à 0,45 avec de la pyridine 20%. On évapore l'éluat à sec par un courant d'air froid. On le rechromatographie sur papier Whatman n°1 (traité comme précédemment) dans le solvant de Haynes et Isherwood (192):

n-propanol 60 volumes
eau 10 volumes
ammoniaque concentrée 30 volumes

On laisse cheminer 60 à 70 heures et on localise les nucléotides comme précédemment Les uridine et guanosine nucléotides séparés par cette méthode ont été identifiés grâce à leur Rf et à leur spectre d'adsorption dans l'ultraviolet après élution des taches par NH_4OH N/20.

c)Minéralisation et dosage:

On sèche le papier à l'air chaud et dn découpe les taches que l'on place dans un matras. On ajoute successivement : 0,3 ml de SO_4H_2 concentré, 0,5 ml d'$HClO_4$ 60% et deux gouttes d'une solution de molybdate d'ammonium 2,5%. On chauffe très doucement jusqu'au démarrage de la réaction catalysée par le molybdate d'ammonium, puis plus fort. Dès l'apparition d'une coloration jaune, on arrête la minéralisation. Le phosphate est dosé par la méthode de Berenblum et Chain (189). Les nucléotides libres sont estimés d'après leur teneur en phosphate.

Dans tous les cas, les rendements de la méthode chromatographique ont été contrôlés en faisant des chromatographies parallèles avec des extraits additionnés de quantités connues de divers nucléotides. Ceci a permis de constater que la récupération des nucléotides est toujours comprise entre 90 et 100%.

4 - Dosage spécifique de l'adénosine triphosphate.

L'adénosine triphosphate a été dosé parallèlement par chromatographie et grâce à la méthode de Strehler et Totter (193) dont le principe est le suivant: la luminescence produite par addition d'ATP à un extrait d'organes lumineux d'insectes "Photinus pyralis" est proportionnelle, entre certaines limites de concentration à la quantité d'ATP ajoutée, d'où la possibilité d'un dosage spécifique de l'ATP en présence d'autres nucléotides libres en particulier d'ADP. On procède au dosage de la façon suivante:

- Préparation de l'extrait à doser:
  1 volume d'extrait trichloracétique de muscle est extrait quatre fois à l'éther à 0° afin d'éliminer l'acide trichloracétique, on procède de la même façon qu'il est indiqué au paragraphe 3 avant l'adsorption des nucléotides sur charbon.

- Préparation de l'extrait enzymatique de Photinus pyralis:
  on broie dans un mortier environ 25 organes lumineux de Photinus pyralis, en présence de 10 ml de tampon arséniate de Na 0,1 M de pH 7,4 à 0°. On centrifuge le broyat à 0° pendant 20 minutes. On recueille le surnageant et on y dissout 100 mg de $MgSO_4$ 7 H_2O. Cette préparation conservée à 0° reste active pendant plusieurs jours. Une légère précipitation d'arséniate de Mg^{++} ne perturbe pas le dosage si la suspension est maintenue homogène.

- Dosage:
  dans une cuve à faces parallèles on met dans l'ordre: 0,1 ml de l'extrait enzymatique de Photinus pyralis, une quantité adéquate de tampon arséniate de Na 0,1 M à pH 7,4 (on opère toujours de façon à avoir un volume final de 1 ml). On mélange avec un agitateur de verre. On introduit rapidement la cuve dans l'appareil à mesurer la luminescence et on ajuste le galvanomètre au zéro. On ajoute alors rapidement un volume connu de prise d'essai. On agite à nouveau de façon à assurer l'homogénéité et l'oxygénation du milieu. On mesure la déviation du galvanomètre 20 secondes après addition de la prise d'essai contenant l'ATP. Pour chaque extrait à analyser, on fait plusieurs mesures avec des volumes différents d'extrait afin de vérifier le caractère linéaire de la relation. On fait aussi chaque fois une courbe étalon avec une solution standard d'ATP. Les solutions standard d'ATP sont étalonnées soit par des essais enzymatiques en présence de myosine du muscle ou d'apyrase de pomme de terre, soit par dosage après séparation chromatographique sur papier.

- Appareillage pour la mesure de la luminescence:

les mesures ont été faites avec un appareil réalisé selon les indications de G.V.R. Born (Nuffield Institute, Oxford). Le montage comporte une cellule photo-électrique reliée à un amplificateur et à un galvanomètre.

- Sources d'erreur:

les causes d'erreur les plus importantes sont: le manque d'oxygène (on agite pour y remédier), la présence d'anions monovalents qui inhibent le développement de la luminescence ainsi que des traces d'acide trichloracétique. On contrôle l'absence d'inhibiteurs grâce à un dosage de standards internes. La concordance entre cette méthode de dosage de l'ATP et la méthode chromatographique décrite au paragraphe 3 s'est révélée parfaite.

5 - Dosage spécifique de la créatine et de la phosphocréatine.

La phosphocréatine est dosée selon la technique d'Ennor et Rosenberg (194) par la mesure de la créatine libérée après hydrolyse acide. Ennor et Stoken (195) ayant montré qu'en milieu alcalin on pouvait doser la créatine en présence de phosphocréatine, cette dernière parfaitement stable dans ces conditions ne donnant pas de coloration, Ennor et Rosenberg dosent dans un extrait neutralisé la créatine libre. La créatine totale de l'extrait est dosée après une hydrolyse acide modérée qui permet d'hydrolyser totalement la phosphocréatine sans formation appréciable de créatinine (196). La différence entre la créatine totale et la créatine libre permet d'évaluer la phosphocréatine. On opère de la façon suivante: une partie aliquote de l'extrait trichloracétique de muscle est neutralisée par addition d'un volume connu de NaOH 0,4 N jusque vers pH 7,3. Dans ces conditions, la phosphocréatine est stable. On dose en parallèle la créatine totale et la créatine libre.

- Dosage de la créatine libre:

On prend 0,5 ml de prise d'essai et on ajoute dans l'ordre: 0,5 ml de parachloromercuribenzoate de sodium 0,05 M, 0,5 ml de α-naphtol à 1% (préparé extemporanément en dissolvant l'α-naphtol dans un milieu alcalin de stock à 61 g de NaOH et 160 g de Na_2CO_3 par litre) et enfin 0,5 ml du réactif au diacétyl. On complète le volume total de chaque essai à 5 ml avec de l'eau distillée. On agite et on laisse la coloration se développer à l'obscurité , à température ordinaire pendant 30 minutes. Les lectures sont faites avec un photocolorimètre Coleman Jr. à 535 mμ

Le réactif au diacétyl est préparé en chauffant 1,6 g de diméthylglyoxime R.P. en présence de 200 ml de H_2SO_4 5 N dans un appareil à distiller en verre. On distille et on recueille les cinquante premiers ml. Ce distillat est dilué à 100 ml avec de l'eau distillée et conservée à 0°. Au moment de l'emploi, un volume de cette solution est dilué à 20 volumes avec de l'eau distillée. Des gammes standard sont faites dans les mêmes conditions que les essais réels et on vérifie dans tous les cas l'absence d'inhibiteurs de la coloration par des dosages de standards internes.

6 - Dosage du glucose.

a) Mesure des consommations de glucose dans les milieux d'incubation:

La quantité de glucose consommé par les diaphragmes est exprimée en mg de glucose consommé pendant 1 heure par un gramme de poids frais de tissu. Les diaphragmes sont incubés individuellement dans une cellule à glycolyse d'un appareil de Warburg dans 2,5 ml d'un tampon contenant 2 mg/ml de glucose comme il sera indiqué plus loin. On joint à ces essais une cellule témoin contenant seulement 2,5 ml de tampon, cette cellule sera incubée dans les mêmes conditions que les cellules contenant les diaphragmes. La quantité de glucose consommée par un diaphragme est calculée par différence entre la quantité contenue dans le milieu d'incubation (cellule témoin) et la quantité restant après incubation d'un diaphragme pendant un temps donné. On opère de la façon suivante:

- Déprotéinisation: le glucose est dosé dans un milieu d'incubation après déprotéinisation, par la méthode de Nelson (197), de 1 ml de prise d'essai au moyen de NaOH 0,3 N et de $ZnSO_4$ 7 H_2O (2 ml, de la solution à 5%). On ajuste à 10 ml et on filtre sur papier.

- Dosage: le glucose est dosé par la méthode de Somogyi (198).

  - Préparation des réactifs: le réactif cuproalcalin.

    On mélange extemporanément 1 volume de solution A : SO_4Cu 15 %, à 25 volumes de solution B qui comprend: Na_2CO_3 anhydre 25 g
    $NaHCO_3$ 20 g
    tartrate NaK 25 g
    On ajuste à 1.000 ml avec de l'eau distillée.

    le réactif arsénio-molybdique.
    Ce réactif est préparé par addition à 450 ml d'eau distillée de :
    molybdate NH_4 25 g
    SO_4H_2 concentré 25 ml
    arséniate de Na 15 ml d'une solution à 12%.
    On maintient 48 heures à 37°. On centrifuge et conserve en flacon rôdé à l'obscurité.

- Mode opératoire: on ajoute dans un tube à essai: 1 ml de prise d'essai contenant de 0 à 200 µg de glucose par ml et 1 ml de réactif cuproalcalin. On laisse au bain-marie bouillant pendant exactement 20 minutes, puis on refroidit de suite. On ajoute alors 1 ml de réactif arsénio-molybdique, on agite et on ajuste à 10 ml avec de l'eau distillée. La coloration se développe et on fait les lectures au photocolorimètre à 500 mµ. Des gammes standard sont dosées dans les mêmes conditions et parallèlement aux essais réels.

b) Dosage chromatographique du glucose libre des tissus:

Le glucose libre a été dosé sur l'extrait trichloracétique de diaphragme par une méthode chromatographique. On opère de la manière suivante: l'extrait est traité quatre fois à l'éther à froid afin d'éliminer l'acide trichloracétique. L'extrait est ensuite désionisé par passage sur la résine Amberlite MB_3, le glucose qui n'est pas retenu sur la colonne est dosé quantitativement par chromatographie sur papier. Le solvant utilisé est celui décrit par Bourrillon et Michon (199), butanol 5 volumes/pyridine 4 volumes/ HCl 0,1 N 1 volume. Le glucose ainsi séparé a été dosé par la méthode de Trevelyan (200) utilisant la réduction du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium en milieu alcalin. Le papier est trempé dans une solution chloroformique du réactif, puis, après pulvérisation d'une solution de soude 0,5 N, on porte à 50° pendant 20 minutes dans une enceinte saturée de vapeur d'eau. Le glucose apparaît sous forme de taches rouge vif. On découpe les taches et on élue le colorant par le solvant de Wallenfels (201): pyridine 90 %, HCl concentré 10 %. L'absorption de la solution colorée est mesurée au photocolorimètre à 485 mµ. On chromatographie parallèlement à l'essai réel des quantités connues de glucose ce qui permet de tracer une courbe standard. Des expériences témoins ont montré qu'il n'y avait au cours de cette chromatographie aucune perte de glucose.

7 - Mesure de la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés au moyen de ^{32}P.

La mesure de la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du muscle a été réalisée *in vivo* et *in vitro* à l'aide de phosphore radioactif sous forme de $Na_2H^{32}PO_4$ en solution $NaCl/NaHCO_3$ isotonique. Les activités spécifiques des différents composés du muscle qui contiennent du phosphore ont été déterminées sur l'extrait trichloracétique après isolement de chacun de ces composés comme il est décrit plus haut. Ces composés ont été séparés suivant les cas par extraction ou par la méthode chromatographique décrite précédemment. On dose le phosphate par la méthode de Berenblum et Chain (189) et on mesure la radioactivité de chaque fraction à l'aide

d'un compteur Geiger (Tracerlab TGC-2) à fenêtre sous une tension de 1.500 volts. Dans ce but, un aliquot de chaque fraction est prélevé et évaporé dans une cupule de verre sous une lampe infrarouge.

a) Expérience in vivo:

L'animal est sacrifié par décapitation. L'utérus ou le diaphragme sont prélevés afin de préparer l'extrait trichloracétique. Le sang est recueilli sur une goutte d'héparine. On met 0,1 ml de sang dans 10 ml d'acide trichloracétique à 10 %, puis on centrifuge. On dose le phosphate minéral du sang sur 5 ml de cet extrait par la méthode de Berenblum et Chain. Le phosphate minéral contenu dans la prise d'essai est extrait par l'isobutanol, le comptage est effectué sur 0,1 ml de la phase isobutanolique.

b) Expérience in vitro:

Les animaux sont tués par décapitation. Les utérus ou les diaphragmes sont disséqués à 0°. Suivant les cas, les diaphragmes sont lavés pendant 5 minutes à 37° dans un milieu Krebs-Ringer bicarbonate (202) (10 ml pour 2 diaphragmes) sous une atmosphère de 95% O_2 + 5% CO_2. Les diaphragmes sont séchés soigneusement et réincubés séparément. Pour le diaphragme comme pour l'utérus l'incubation s'effectue dans des cellules à glycolyse d'un appareil de Warburg à 37° dans 2,5 ml de milieu Krebs-Ringer bicarbonate contenant $MgSO_4$ aux concentrations de $5,9.10^{-3}$M ou $11,2.10^{-3}$M sous une atmosphère de 95% O_2 + 5% CO_2 et une agitation constante. Les cellules sont gazées et chauffées durant 10 minutes avant le début de l'incubation. Après addition des organes disséqués, le gazage est continué pendant 5 minutes.
Le phosphate radioactif $Na_2H^{32}PO_4$ (10 à 20 µc dans 0,1 ml de solution NaCl/$NaHCO_3$ isotonique) est alors renversé et l'incubation poursuivie pendant les temps indiqués
Le milieu d'incubation contient ou non, selon les cas, un ou plusieurs substrats: glucose 2 mg/ml, β-hydroxybutyrate 2 mg/ml, et de l'insuline 10 µg/ml. A la fin de l'incubation, les organes sont prélevés, refroidis immédiatement à 0°, séchés soigneusement et pesés. Le broyage et la centrifugation s'effectuent, comme nous l'avons indiqué, dans 10 ml d'acide trichloracétique à 10%.

c) Traitement de l'extrait trichloracétique de muscle de rat:

- Le phosphate total de l'extrait est déterminé par la méthode de Berenblum et Chain (189) sur 0,5 ml, comme nous l'avons indiqué précédemment. Le comptage de la radioactivité s'effectue sur 0,1 ml.

- séparation et détermination de l'activité spécifique du phosphate minéral et de la phosphocréatine: on prélève 1,5 ml de l'extrait dans un tube gradué, maintenu à 0°, contenant 0,5 ml de molybdate d'ammonium à 2,5 % et 1,5 ml d'isobutanol. On agite 30 secondes. Le phosphate minéral passe entièrement dans l'isobutanol à l'état de complexe phosphomolybdique. La phase inférieure contenant le phosphate organique non hydrolysé est transférée immédiatement dans un autre tube gradué avec une pipette effilée en faisant très attention de ne pas entraîner de contaminations provenant de la phase supérieure ce qui peut provoquer de très légères pertes de la phase inférieure. La phase isobutanolique est ajustée à 5 ml avec de l'isobutanol. Le dosage de phosphate est effectué sur 0,5 ml et le comptage de la radioactivité sur 0,1 ml de cette solution. On abandonne la phase inférieure pendant une heure à température ordinaire, ce qui permet l'hydrolyse complète de la phosphocréatine. A ce moment, on l'ajuste à 2,5 ml avec de l'eau saturée d'isobutanol et on extrait avec 2,5 ml d'isobutanol. La phase supérieure isobutanolique contient alors le phosphate provenant de la phosphocréatine. Le dosage de phosphate est effectué sur 0,5 ml et la radioactivité comptée sur 0,2 ml. Des expériences préliminaires réalisées en utilisant des mélanges de phosphate radioactif et de phosphocréatine non marquée ont montré qu'il ne se produisait aucune contamination de la phosphocréatine avec la radioactivité du phosphate minéral durant leur séparation,et que le pourcentage de phosphocréatine hydrolysée dans l'extrait trichloracétique pendant l'homogénéisation, la centrifugation à 0° et l'extraction du phosphate minéral était voisin de 5%,ne dépassant jamais 10%. Dans ces conditions, la contamination du phosphate minéral avec du phosphate provenant de l'hydrolyse de la phosphocréatine peut faire baisser la radioactivité spécifique du phosphate minéral de 2 à 3% environ. Nous n'avons pas fait de correction pour tenir compte de cette contamination.

La séparation du phosphate minéral et de la phosphocréatine n'a été effectuée que dans le cas du diaphragme, l'utérus ne contenant que des quantités négligeables de phosphocréatine.

- détermination du phosphate minéral extracellulaire et intracellulaire: le phosphate extracellulaire est en équilibre avec celui du milieu d'incubation: 0,5 ml de ce milieu sont prélevés, déprotéinisés à l'aide de 9,5 ml d'acide trichloracétique à 10% et centrifugés. Le phosphate est dosé par la méthode de

Berenblum et Chain sans minéralisation préalable sur 2 ml de la dilution trichloracétique et le comptage de la radioactivité effectué sur 0,1 ml. Le phosphate intracellulaire est calculé par différence entre le phosphate minéral total et le phosphate extracellulaire en tenant compte d'un espace extracellulaire mesuré comme il est indiqué plus loin. Pour de très courtes périodes d'incubation (2 minutes) l'activité spécifique du phosphate intracellulaire est très faible par rapport à celle du phosphate extracellulaire: l'erreur sur l'activité spécifique du phosphate intracellulaire peut dans ce cas, être assez importante.

- détermination du taux et de la radioactivité spécifique des nucléotides: l'adsorption des nucléotides sur Norit SX-30 ou SX-11 et leur séparation chromatographique sur papier sont effectuées comme il est indiqué plus haut. La chromatographie sur papier de chaque extrait est faite en double: une série de taches sert au dosage du phosphore, l'autre série à la détermination de la radioactivité de chaque nucléotide. A cet effet, chaque tache est éluée au moyen de NH_4OH N/10, directement dans une cupule de verre, puis comptée après évaporation. Des comptages témoins sont faits sur l'éluat des colonnes de Norit, qui ne contient que les nucléotides. Ces comptages permettent de déterminer le rendement en radioactivité de la chromatographie sur papier; celui-ci est toujours compris entre 95 et 100%. Il n'y a aucune contamination des nucléotides par du phosphate minéral marqué au cours de la chromatographie.

- détermination du taux et de la radioactivité spécifique du "phosphate résiduel": nous avons désigné sous le nom de "phosphate résiduel" l'ensemble des composés phosphorylés qui ne sont ni adsorbés sur charbon comme les nucléotides, ni extraits par l'isobutanol après une hydrolyse éventuelle à température ordinaire, comme l'orthophosphate et la phosphocréatine. Dans le muscle strié comme dans le diaphragme, cette fraction semble être composée essentiellement d'intermédiaires phosphorylés de la glycolyse en particulier le glucose-6-phosphate (18), dans le muscle lisse elle est quantitativement beaucoup plus importante et semble contenir une grande quantité de phosphates à très faible vitesse de renouvellement qui n'ont pas été jusqu'ici identifiés. Le filtrat des colonnes est transféré dans un tube gradué, on ajoute successivement 1 ml d'HCl concentré et 0,5 ml de molybdate d'ammonium à 2,5 %. On ajuste le volume final à 10 ml. On laisse hydrolyser à

température ordinaire pendant 2 ou 3 heures (seulement dans le cas du diaphragme qui contient de fortes quantités de phosphocréatine), puis on extrait 4 fois avec un volume égal d'isobutanol ce qui élimine le phosphate minéral et le phosphate provenant de l'hydrolyse de la phosphocréatine. La phase inférieure est ensuite réajustée à 10 ml. Le comptage de la radioactivité se fait sur 1 ml et le phosphate est dosé (sur 1 ml) après minéralisation par la méthode de Berenblum et Chain.

d) Calcul séparé des radioactivités spécifiques:

La quantité et la radioactivité spécifique du phosphate intracellulaire ont été calculées, comme nous l'avons indiqué, à partir du phosphate extracellulaire et du phosphate minéral total connaissant, l'espace extracellulaire du tissu. Les radioactivités spécifiques de la phosphocréatine et du "phosphate résiduel" ont été déterminées par des mesures directes comme il est dit plus haut. Des expériences témoins ont prouvé qu'en 30 minutes (temps d'incubation maximum employé au cours de ce travail) il n'y avait aucune incorporation de ^{32}P dans les groupes phosphorylés liés au ribose des adénosine , uridine et guanosine phosphates.

- ADP : toute la radioactivité de ce composé est celle du seul phosphate labile.
- ATP : la radioactivité spécifique du phosphate terminal est calculée en admettant que le second phosphate de ce composé est en équilibre isotopique avec le phosphate labile de l'ADP. L'exactitude de cette hypothèse repose sur les travaux de Fleckenstein et al. (203) qui ne constatent aucune différence entre l'activité spécifique de l'ADP et celle du second groupe de l'ATP dans le muscle isolé, ainsi que sur les travaux de Harth et Mandel qui montrent que dans les tissus qu'ils étudient l'ADP isolé par chromatographie sur colonne est en grande partie un artefact et dérive de l'ATP par hydrolyse du phosphate terminal au cours des procédés d'extraction et d'isolement (204).
- Uridine et guanosine phosphates: les uridine et guanosine phosphates n'ont pas été séparés entre eux au cours des mesures de vitesse de renouvellement. La radioactivité de cette fraction a été calculée en admettant que tous les uridine et guanosine phosphates sont présents à l'état d'UTP et de GTP. Ainsi, l'activité spécifique calculée est la limite inférieure de l'activité spécifique réelle des composés présents.

8 - Mesure de l'espace extracellulaire de l'utérus et du diaphragme incubés.

Au cours de ce travail, les espaces extracellulaires de l'utérus et du diaphragme ont été mesurés in vitro directement à l'aide du ^{32}P employé. L'équilibre isotopique entre l'espace extracellulaire et le milieu d'incubation paraît être atteint très rapidement (en moins de 2 minutes) alors que le phosphate ne pénètre que très lentement à l'intérieur des cellules. Il en résulte que la courbe indiquant la radioactivité totale de l'organe incubé (exprimée en pour cent de la radioactivité totale d'un même poids de milieu d'incubation) en fonction du temps d'incubation, est constituée à partir de 2 minutes par une droite à faible pente. Il suffit alors d'extrapoler cette droite au temps t = 0 pour obtenir directement sur l'axe des ordonnées la valeur de l'espace extracellulaire de l'organe étudié en pour cent de son volume total.

a) Espace extracellulaire de l'utérus (figure 1):

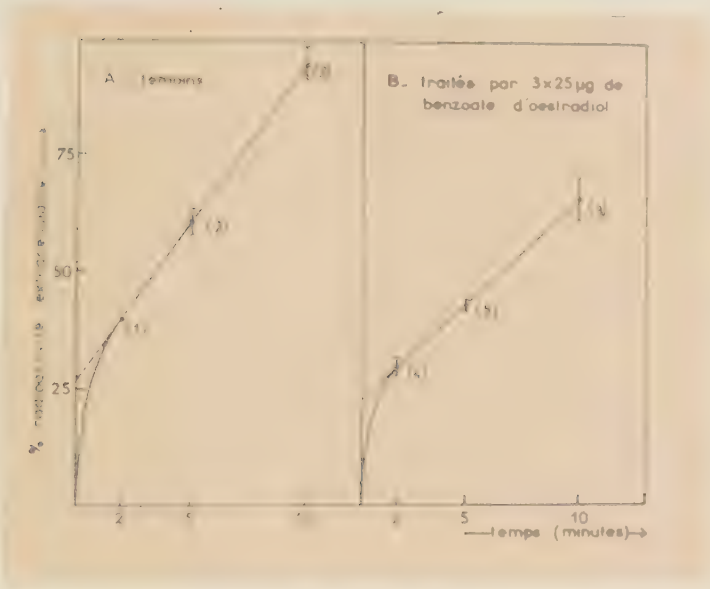


FIGURE 1: Incorporation de ^{32}P dans l'extrait trichloracétique d'utérus de rat ovariectomisé, traité ou non par l'oestradiol. La radioactivité totale du tissu est exprimée en % d'un poids équivalent de milieu extracellulaire. Les points individuels représentent la moyenne du nombre de déterminations indiqué entre parenthèses. L'erreur standard ± sur la moyenne est exprimée par les barres verticales. L'extrapolation au temps t = 0 donne la valeur de l'espace extracellulaire en % du poids total du tissu.

L'espace extracellulaire de l'utérus a été mesuré in vivo par différents auteurs Cole (205), Matray (206) Halkerston (121) en particulier à l'aide de SCN^-. Cole (205) a trouvé chez le rat ovariectomisé une valeur d'environ 29%; cette valeur augmen-

terait sous l'influence de l'oestradiol pour atteindre 40 à 50% (205, 206, 121). La mesure de l'espace extracellulaire que nous avons faite in vitro nous a donné pour le rat ovariectomisé une valeur de 27,5% voisine de celle trouvée par Cole. Au contraire, chez le rat traité à l'oestradiol, l'espace extracellulaire n'est que de 22,5%, cet espace n'étant pas modifié par addition de progestérone à l'oestradiol injecté. Kao (207) mesurant, également in vitro au moyen d'inuline, l'espace extracellulaire d'utérus de lapin n'a pas trouvé de différence entre l'espace extracellulaire d'animaux impubères et celui d'animaux traités à l'oestradiol. Le fait que les espaces extracellulaires trouvés in vitro et in vivo chez le rat traité à l'oestradiol varient du simple au double reste inexpliqué. Halkerston et al. (121) admettent que les composés généralement utilisés pour mesurer l'espace extracellulaire des tissus tels l'inuline, le SCN^-, pourraient pénétrer dans le tissu utérin.

b) Espace extracellulaire du diaphragme (figure 2):

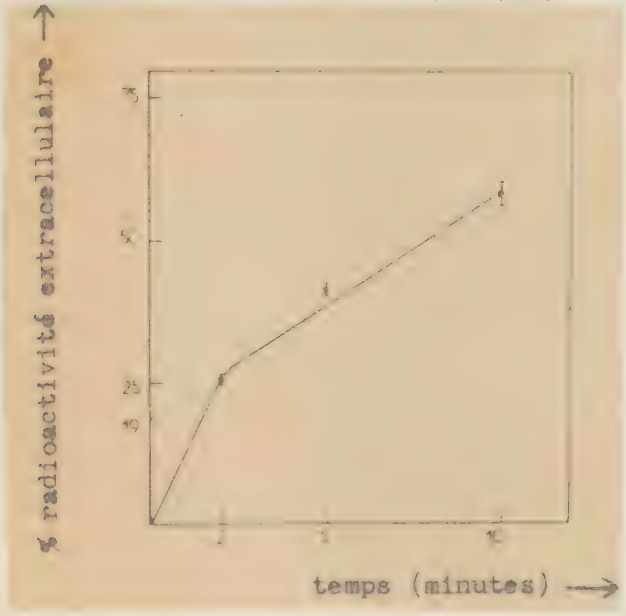


FIGURE 2: Incorporation de ^{32}P dans l'extrait trichloracétique de diaphragme de rat.

La droite a été tracée suivant la méthode des moindres carrés.

La mesure de l'espace extracellulaire du diaphragme a été obtenue de la même façon que pour l'utérus. La linéarité de la pénétration du phosphate est moins parfaite que pour cet organe. La valeur trouvée a été de 19 % ± 0,65. Cette valeur est très voisine de celle trouvée par Kipnis et Cori (46) sur le diaphragme intact à l'aide de raffinose: 18%.

L'insuline et le glucose ne modifient pas, quand ils sont ajoutés au milieu d'incubation, la valeur de l'espace extracellulaire.

9 - Calculs statistiques.

Dans l'étude d'un phénomène biologique, les résultats des nombreuses mesures se groupent autour d'une valeur moyenne. Les différences sont dues à la précision des techniques mais aussi aux variations individuelles entre les animaux utilisés. Il est nécessaire de savoir avec quelle précision est obtenue la valeur moyenne et dans quelles limites sont comprises les valeurs mesurées. Lorsque l'on compare deux séries de mesures, dont les valeurs moyennes diffèrent, il convient de déterminer si cette différence n'est pas simplement due au hasard. Il faut pour cela procéder à l'analyse statistique des résultats. Les formules statistiques utilisées au cours de ce travail sont rappelées ci-dessous.

- Moyenne arithmétique: les moyennes indiquées dans nos tableaux sont des moyennes arithmétiques.

- Moyenne arithmétique des écarts: c'est la somme des écarts des valeurs individuelles par rapport à la moyenne arithmétique divisée par le nombre des observations. Nous indiquons dans nos tableaux après le poids moyen des rats utilisés, la moyenne arithmétique des écarts ce qui permet d'évaluer l'homogénéité des lots de rats utilisés.

- Déviation standard de la moyenne: l'erreur standard sur la moyenne indique avec quelle précision la moyenne a été déterminée, elle est définie par la formule:

$$\sigma M = \sqrt{\frac{(x - M)^2}{N(N - 1)}}$$

où x = une valeur individuelle
M = la moyenne arithmétique des valeurs
N = le nombre des observations.

- Différences significatives: la formule de Student permet d'apprécier si une différence entre deux moyennes est significative ou seulement due au hasard:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{S} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}} \quad \text{où :}$$

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma (x - M_1)^2 + \Sigma (x - M_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

M_1 et M_2 sont les moyennes des observations des groupes 1 et 2;
N_1 et N_2 représentent le nombre des observations pour les groupes 1 et 2;
t permet de comparer deux moyennes en fonction de leur déviation standard.

Connaissant t on trouve dans les tables de Fischer la probabilité P pour laquelle la différence observée peut être due au hasard.

- Blocs casualisés: cette méthode d'analyse statistique a été utilisée au cours de l'étude de l'effet de l'insuline et de l'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des différents phosphates organiques. Une influence hormonale a été mise en évidence au cours de chaque expérience, mais des variations appréciables existent d'une expérience à une autre, en particulier si on considère la radioactivité spécifique des fractions organiques par rapport à celle du phosphate intracellulaire. Ces variations sont dues d'une part à la concentration de Mg^{++} employée et d'autre part aux variations de poids des diaphragmes utilisés. Pour cette raison l'analyse statistique de ces expériences a été effectuée selon la méthode dite des "blocs casualisés" qui est employée chaque fois que les résultats d'une expérience ou d'une série d'expériences comportant plusieurs traitements doivent être comparés entre eux de préférence aux autres séries d'expériences. Les différences entre"blocs " (ou séries d'expériences dans notre cas) sont alors éliminées par l'analyse factorielle comme n'étant pas dues au hasard. Il est évidemment nécessaire que chaque bloc comprenne autant d'unités expérimentales qu'il y a de traitements. Les détails d'une telle analyse sont indiqués dans l'ouvrage de Lison (208).

Dans tous les cas, nous considérons qu'une différence est statistiquement significative lorsque $P < 0,01$.

Si P est compris entre 0,05 et 0,01 la différence est probablement significative.

Si P est supérieur à 0,05 la différence est considérée comme étant due au hasard.

R E S U L T A T S

A - ETUDE DU TAUX ET DE LA VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES D'UN MUSCLE STRIE: LE DIAPHRAGME.

I - TAUX DU PHOSPHATE MINERAL, DE LA PHOSPHOCREATINE ET DES NUCLEOTIDES LIBRES DU DIAPHRAGME.

1 - Diaphragme non incubé.

L'étude du taux du phosphate minéral, de la phosphocréatine et des nucléotides libres a été réalisée sans incubation préalable. Le diaphragme disséqué est immédiatement homogénéisé dans l'acide trichloracétique sans être congelé. Nous verrons plus loin lors de l'étude de l'utérus, combien la congélation modifie le taux des nucléotides.

Dans le Tableau I, nous rapportons les valeurs trouvées dans le diaphragme de rat normal. La valeur trouvée pour la phosphocréatine est voisine de celle trouvée par Fleckenstein et Janke (36) dans le muscle cardiaque de rat (environ 6 µM/g poids frais); elle est très supérieure à celle trouvée précédemment par Mommaerts également sur le muscle cardiaque (2 µM/g poids frais). Le niveau de la phosphocréatine dans le diaphragme est très inférieur à ce qu'il est dans le muscle strié pour lequel Mommaerts (209) indique une valeur de 20 µM/g poids frais et Threlfall (184), de 15,5 µM/g poids frais.

Le taux d'ATP du diaphragme est voisin de la valeur trouvée par Fleckenstein et Janke (36) dans le muscle cardiaque de rat (4,3 µM/g poids frais) et légèrement inférieur aux valeurs trouvées sur le muscle du squelette par Mommaerts (5 µM/g poids frais) et par Threlfall (6 µM/g poids frais).

D'une façon générale, la teneur en nucléotides libres du diaphragme, que nous rapportons ici, est très supérieure à celle trouvée par Rye-Alertsen, Walaas et Walaas (210) (2,11 µM/g poids frais pour l'ATP, 0,52 pour l'ADP, 0,16 pour l'AMP et 0,11 pour la somme des guanosine et uridine triphosphates). Ceci peut être dû au lavage

préalable de ces diaphragmes dans le Krebs-Ringer phosphate à 0° et également au procédé d'homogénéisation employé par ces auteurs.

Le taux des uridine et guanosine nucléotides est très faible, surtout comparé à celui trouvé dans l'utérus comme nous le verrons plus loin.

Nous rapportons dans le Tableau I l'analyse détaillée de ces nucléotides dans le diaphragme. Nous les avons séparés, comme il est dit plus haut, grâce aux solvants n-propanol/ammoniaque concentrée/eau (Haynes et Isherwood (192)) qui provoque une hydrolyse partielle de ces composés, l'UDP-glucose est également instable dans ces conditions (38). Le rapport des guanosine et des uridine nucléotides exprimé en molécules par gramme de poids frais est voisin de 1 et n'est pas affecté par cette hydrolyse. Le travail de Matray (206) qui rapporte une diminution importante de la phosphocréatine dans le diaphragme de rat injecté d'adrénaline et l'influence de l'hypophysectomie constatée sur le taux des nucléotides du diaphragme après incubation, suggèrent qu'il existe des variations du taux des composés phosphorylés du diaphragme sous l'influence de diverses actions hormonales. Ces variations sont cependant, quantitativement, beaucoup moins importantes que dans l'utérus et n'ont pas été étudiées en détail au cours du présent travail.

2 - Diaphragme incubé.

Les niveaux des composés phosphorylés sont très différents dans le diaphragme incubé de ceux trouvés (Tableau I) dans le diaphragme non incubé.

Chez le rat normal (Tableau II) le phosphate minéral est augmenté d'environ 35%, les composés organiques sauf la phosphocréatine ont au contraire un niveau de 40 à 50% plus faible qu'avant incubation. La durée de l'expérience ne semble modifier les taux en aucune façon. Il n'y a aucune influence de l'insuline ou du glucose sur le taux des composés phosphorylés du diaphragme sauf en ce qui concerne le "phosphate résiduel" qui est fortement augmenté en présence de glucose ($P < 0,01$) par rapport aux témoins sans glucose. Ceci est normal dans la mesure où cette fraction est essentiellement composée d'intermédiaires de la glycolyse.

Chez les rats hypophysectomisés (Tableaux III, IV, V), le niveau des phosphates organiques est plus faible que chez le rat normal pour un même temps d'incubation. La présence ou l'absence de substrats (glucose et β-hydroxybutyrate) ou l'action de l'insuline ou de l'hormone de croissance ne modifient pas ces taux sauf en

TABLEAU I

Mononucléotides acido-solubles dans le diaphragme de rat

	µg P/100 mg poids frais	µM/ g poids frais
P.I.	24 ± 0,9	7,75
P.C.	17 ± 1,3	5,50
ATP	37 ± 0,9	3,98
ADP	12 ± 0,9	1,94
AMP	1,8 ± 0,35	0,58
G + U*	3,6 ± 0,2	0,60
DPN	3,8 ± 0,2	0,60
IMP	4,9 ± 0,34	1,58
	* Guanosine + Uridine	
GTP	0,48	
GDP	0,43	0,32
GMP	0,62	
UTP	0,58	
UDP	0,84	
UMP	0,09 (0,18)	0,28
(de l'UDP glucose)		
UDPAG	0,33	

TABLEAU II: Influence de l'insuline sur le taux des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat normal en absence et en présence de substrat (glucose, 2 mg/ml).

µg Phosphate / 100 mg poids frais

	Temps d'incubation : 10 minutes				Temps d'incubation : 30 minutes			
Insuline 10 µg/ml	0	+	0	+	0	+	0	+
Glucose 2 mg/ml	0	0	+	+	0	0	+	+
Nbre expériences	4	4	3	3	2	2	2	2
P.I. intracellulaire	31,7±3,3	33,3±1,9	30,3±2,7	38,4±5,4	35,8±2,6	38,7±0,1	39,7±0,6	35,4±3,8
P. C.	16,1±1,9	13,2±2,9	15,5±3,4	14,0±2,1	15,0±1,5	14,4±1,0	20,0±3,6	17,9±5,1
ATP	29,1±2,8	28,5±2,9	27,9±3,4	20,6±1,1	27,3±0,3	23,4±0,4	28,5±0,7	27,3±1,6
ADP	5,9±0,6	6,1±0,8	5,6±0,4	5,6±1,0	5,3±0,0	5,3±0,7	5,8±0,8	5,5±1,1
U + G *	2,6±0,5	2,5±0,5	1,9±0,4	1,8±0,4	2,1±0,2	1,5±0,1	1,8±0,4	2,4±0,1
"Phosphate résiduel"	4,6±1,0	4,8±1,1	6,4±1,3	7,3±1,6	4,8	4,6	6,1	6,8

* Somme des uridine et guanosine phosphates.

TABLEAU III : Influence de l'insuline sur le taux des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé en absence et en présence de substrats; temps d'incubation 10 minutes.

µg Phosphate / 100 mg poids frais				
Insuline 10 µg/ml	0	+	0	+
Substrats *	0	0	+	+
Nbre expériences	4	2	5	4
P.I. intracellulaire	34,6 ± 1,7	34,2 ± 6,4	33,1 ± 1,9	30,0 ± 2,6
P.C.	13,7 ± 2,3	13,4 ± 1,2	15,2 ± 2,3	20,2 ± 5,2
ATP	22,9 ± 2,3	24,2 ± 0,4	22,4 ± 1,5	23,7 ± 2,5
ADP	6,5 ± 0,7	5,9 ± 0,8	5,9 ± 0,4	5,6 ± 0,6
U + G **	2,3 ± 0,25	2,25 ± 0,05	2,5 ± 0,35	2,1 ± 0,3
"Phosphate résiduel"	5,9 ± 0,8	4,2 ± 1,0	6,6 ± 0,6	6,2 ± 1,3

* glucose (2 mg/ml) + β-hydroxybutyrate (2 mg/ml)

** somme des uridine et guanosine phosphates.

TABLEAU IV: Influence de l'insuline sur le taux des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé traité par l'hormone de croissance (2 x 250 µg), en absence et en présence de substrats; temps d'incubation 10 minutes.

µg Phosphate / 100 mg poids frais				
Insuline 10 µg/ml	0	+	0	+
Substrats *	0	0	+	+
Nbre expériences	4	2	5	4
P.I. intracellulaire	31,4 ± 1,6	34,5 ± 3,0	30,7 ± 4,4	30,7 ± 4,1
P.C.	15,2 ± 2,0	18,4 ± 2,2	19,4 ± 2,9	19,4 ± 2,5
ATP	24,3 ± 1,3	26,5 ± 2,2	24,5 ± 2,4	23,8 ± 3,2
ADP	6,6 ± 1,0	6,4 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,9 ± 0,4
U + G **	2,2 ± 0,4	3,1 ± 0,3	1,8 ± 0,25	2,1 ± 0,23
"Phosphate résiduel"	4,6 ± 0,5	6,6 ± 1,0	5,1 ± 0,6	5,1 ± 0,3

* glucose (2 mg/ml) + β-hydroxybutyrate (2 mg/ml)

** somme des uridine et guanosine phosphates.

TABLEAU V: Influence d'injections d'hormone de croissance sur le taux des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, en absence et en présence d'insuline; temps d'incubation 10 minutes.

	µg Phosphate / 100 mg poids frais							
	sans substrats *				avec substrats			
Hormone de croissance (2 x 250 µg)	0	+	0	+	0	+	0	+
Insuline (10 µg/ml)	0	0	+	+	0	0	+	+
Nbre expériences	4	4	2	2	5	5	4	4
P.I. intracellulaire	34,6 ± 1,6	31,4 ± 1,6	34,2 ± 6,4	34,5 ± 3,0	33,1 ± 1,9	30,7 ± 4,3	25,4 ± 1,5	30,6 ± 1,
P.C.	13,7 ± 1,3	15,2 ± 1,7	13,4 ± 1,1	18,4 ± 2,2	15,2 ± 2,3	19,4 ± 2,9	20,2 ± 4,0	19,4 ± 2,
ATP	22,9 ± 2,3	24,3 ± 1,2	24,2 ± 0,2	26,5 ± 2,2	22,4 ± 1,5	24,5 ± 2,3	23,7 ± 2,4	23,8 ± 3,
ADP	6,5 ± 0,7	6,6 ± 1,0	5,9 ± 0,8	6,4 ± 0,4	5,9 ± 0,4	5,2 ± 0,5	5,6 ± 0,6	5,9 ± 0,
U + G **	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,3 ± 0,05	3,1 ± 0,2	2,5 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,
"Phosphate résiduel"	5,9 ± 0,6	4,6 ± 0,5	4,2 ± 1,0	6,6 ± 1,0	6,6 ± 0,8	5,1 ± 0,6	6,2 ± 1,0	5,1 ± 0,
	P < 0,001				P < 0,001			

* glucose (2 mg/ml) + β-hydroxybutyrate (2 mg/ml)

** somme des uridine et guanosine phopphates.

ce qui concerne le niveau du "phosphate résiduel" qui, en présence ou absence de substrats, est diminué de façon significative par l'hormone de croissance ($P < 0,001$). Cette diminution semble refléter l'inhibition de la phosphorylation du glucose par l'hormone de croissance additionnée ou non de corticostéroïdes, qui a été récemment décrite par Park et al. (80) et paraît au moins s'expliquer partiellement par l'action glycostatique de cette hormone qui est connue depuis longtemps (76).

II - VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES DU DIAPHRAGME in vivo.

Au cours des expériences faites in vivo, le phosphate marqué est injecté par voie intraveineuse aux animaux préalablement anesthésiés, il est admis que le phosphate minéral extracellulaire est en équilibre avec celui du sang. Si l'on suit, comme l'a fait Matray (206), l'évolution de la radioactivité dans le sang de rat en fonction du temps écoulé après l'injection de phosphate radioactif, on voit que la radioactivité spécifique du phosphate minéral du sang baisse de 80% au cours des cinq premières minutes s'écoulant après l'injection. La pénétration du phosphate radioactif dans les cellules du diaphragme étant extrêmement lente, les activités spécifiques des composés phosphorylés seront très faibles et assez variables. Afin d'éliminer ces variations, nous avons exprimé (Tableau VI), les radioactivités spécifiques de la phosphocréatine, de l'ADP et du "phosphate résiduel" en pour cent par rapport à l'activité spécifique du phosphate terminal de l'ATP.

TABLEAU VI: Activité spécifique des phosphates du diaphragme chez le rat anesthésié après injection intraveineuse de $Na_2H^{32}PO_4$ (en % de l'activité spécifique du phosphate terminal de l'ATP).

Temps s'écoulant entre l'injection de ^{32}P et le sacrifice	30 sec.	5 min.	15 min.	20 min.	1 h.	2 h.	4 h.	24 h.
Nbre expériences	3	3	2	2	3	4	2	1
Phosphocréatine	99 ± 6	89 ± 4	73 ± 1	83 ± 3	70 ± 7	80 ± 7	82 ± 10	116
ADP	80 ± 12	108	98 ± 18	104± 6	95 ± 14	98 ± 4	-	100
Phosphate résiduel	-	89	85	88± 10	100	72 ± 14	83 ± 7	65

De l'examen du Tableau VI, on peut tirer les conclusions suivantes: dès les 30 premières secondes, la phosphocréatine et l'ADP sont pratiquement en équilibre avec le phosphate terminal de l'ATP, cet équilibre se maintient sauf en ce qui concerne la phosphocréatine dont l'activité spécifique baisse légèrement, ce qui peut être dû à un certain ralentissement du métabolisme provoqué par l'anesthésie, il faut d'ailleurs noter qu'après 24 heures, l'anesthésie ayant pris fin, la phosphocréatine est de nouveau en équilibre avec le phosphate terminal de l'ATP. Le fait qu'*in vivo*, les deux phosphates labiles de l'ATP, l'ADP et la phosphocréatine soient en équilibre instantané, ne permet pas d'effectuer dans ces conditions l'étude d'une action hormonale sur la vitesse de renouvellement de ces composés. C'est ce qui nous a conduits à entreprendre cette étude *in vitro* sur l'organe survivant.

III - VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES DU DIAPHRAGME, *in vitro*.

L'étude *in vitro* de la vitesse de renouvellement des nucléotides libres a montré,que dans ces conditions, l'équilibre entre les deux phosphates labiles de l'ATP, le phosphate labile de l'ADP et leur précurseur, le phosphate minéral intracellulaire, n'était pas instantané. Dans ces conditions, il était possible de mettre en évidence une action hormonale sur la vitesse de renouvellement de ces fractions. Nous avons étudié successivement l'action de l'insuline et de l'hormone de croissance.

1 - Etude de l'action de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme.

a) Lavage des diaphragmes. Consommation et dosage du glucose.

- L'étude de l'action de l'insuline a été entreprise sur le diaphragme en présence ou non de substrats dans le milieu d'incubation: ces substrats ont été le glucose seul (2 mg/ml) dans le cas des rats normaux, le glucose (2 mg/ml) plus du β-hydroxybutyrate (2 mg/ml) dans le cas des rats hypophysectomisés. Une influence de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme s'exerçant en l'absence de tout glucose ajouté au milieu d'incubation, ne devait pas être due à la petite quantité de glucose apportée par le liquide extracellulaire du diaphragme ou à celle contenue dans les tissus. Afin de pouvoir se placer en l'absence rigoureuse de tout glucose libre extracellulaire, les diaphragmes ont été préalablement lavés 5 minutes à 37°, comme nous l'avons indiqué plus haut.

TABLEAU VII: Influence du lavage sur la consommation de glucose des diaphragmes incubés de rats normaux.

	Lavés		Non lavés	
Nbre d'expériences	8	8	7	7
Insuline (10 µg/ml)	0	+	0	+
mg glucose consommé/ g poids frais / h.	3,18 ± 0,4	6,74 ± 0,56	2,69 ± 0,22	5,49 ± 0,9

Brown et al. (211) ont indiqué qu'un lavage prolongé augmente la consommation de glucose du diaphragme isolé, le Tableau VII montre que chez le rat normal, le lavage de 5 minutes à chaud ne modifie pas sensiblement la consommation des diaphragmes incubés dans un milieu neuf et que l'effet de l'insuline sur cette consommation (+ 112%) est comparable à ce qu'il est sur les diaphragmes non lavés (+ 104 %).

- Le glucose libre contenu dans le diaphragme incubé a été dosé chromatographiquement afin d'éviter toute interférence avec d'autres substances réductrices contenues dans le muscle. La figure 3 montre que lorsque le diaphragme est lavé dans un milieu d'incubation glucosé (2 mg/ml), la quantité de glucose contenue dans le muscle est légèrement plus forte (+ 29%) que la quantité que l'on devrait obtenir si, seul, l'espace extracellulaire était saturé de glucose. Après un lavage de 5 minutes dans un milieu dépourvu de glucose, sans réincuber dans un milieu neuf, la quantité de glucose n'est plus que 10% de la quantité précédente. La présence d'insuline dans le milieu d'incubation ne modifie pas le niveau du glucose libre du diaphragme existant après lavage.

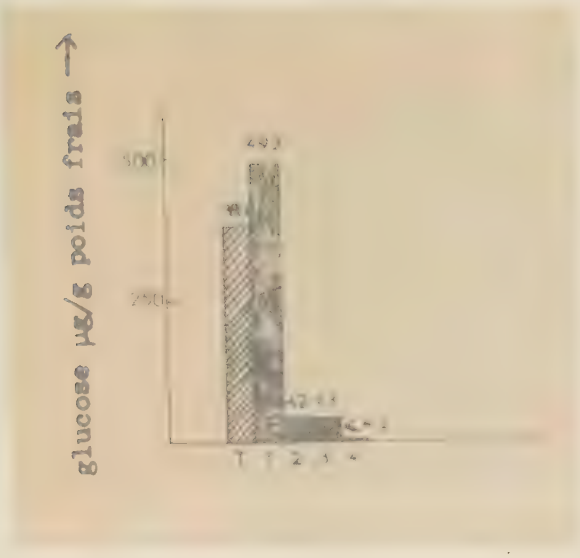


Figure 3: Quantité de glucose contenue dans le diaphragme incubé de rat suivant différentes conditions.

T: valeur théorique pour (1) (espace extracel. de 19%)
1: lavage 5 min., 37°; Krebs-Ringer glucose 2 mg/ml
2: lavage 5 min., 37°; sans glucose
3: lavage 5 min., 37°; sans glucose insuline 10 µg/ml
4: id. 3 + incubation dans milieu neuf pendant 15 minutes.

Une réincubation dans un milieu Krebs-Ringer bicarbonate neuf (2,5 ml) ne contenant pas de glucose, diminue encore la quantité de glucose libre du muscle à une valeur inférieure à 4,2 µg de glucose/g poids frais. Cette valeur très faible peut provenir d'une hydrolyse partielle du glucose-1-phosphate ou même du glycogène survenant lors de l'extraction et de la séparation chromatographique.

Dans ces conditions, on est certain que lorsque le ^{32}P est renversé, les diaphragmes incubés dans des milieux dépourvus de substrats, contiennent des valeurs pratiquement nulles de glucose.

b) Influence des ions magnésium sur le marquage des phosphates du diaphragme isolé.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, deux concentrations de Mg^{++} ont été utilisées. La plus forte concentration de Mg^{++} diminue la vitesse de pénétration du phosphate minéral dans le diaphragme et augmente le pourcentage de marquage des phosphates organiques par rapport au phosphate minéral intracellulaire. L'effet de l'insuline sur le marquage des différents groupes phosphorylés est identique aux deux concentrations de Mg^{++} employées.

c) Vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme de rat normal.

Nous avons étudié, comme le montrent les Tableaux VIII (sans glucose) et IX (avec glucose), l'activité spécifique du phosphate minéral intracellulaire en pour cent de celle du phosphate extracellulaire, et la radioactivité spécifique des différents phosphates organiques labiles en pour cent de celle du phosphate

TABLEAU VIII: Influence de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat normal en absence de substrat.

	Activité spécifique (% P extracellulaire)		Activité spécifique (% P intracellulaire)			Activité spécifique (% P terminal de l'ATP)		
	A - Temps d'incubation : 10 minutes							
Insuline 10 µg/ml Nbre expériences	0 3	+ 3	0 3	+ 3	P*	0 4	+ 4	P*
P.I. intracellulaire	6,0 ± 1,0	5,0 ± 0,4	-	-	-	-	-	-
P.C.	-	-	43 ± 2,8	56 ± 6,8	0,001	104 ± 3,8	100 ± 3,6	
ATP **	-	-	42 ± 4,8	56 ± 6,0		-	-	
ADP ***	-	-	22 ± 1,7	37 ± 4,9	0,01	49 ± 7,9	61 ± 6,0	0,01
U + G ****	-	-	30 ± 2,8	52 ± 1,4	0,05	77 ± 6,0	93 ± 12	
"Phosphate résiduel"	-	-	36 ± 5,7	45 ± 5,4	-	73 ± 5,5	63 ± 5,9	-
	B - Temps d'incubation : 30 minutes							
Insuline 10 µg/ml Nbre expériences	0 2	+ 2	0 2	+ 2	P*	0 2	+ 2	P*
P.I. intracellulaire	19,6 ± 0,6	19,1 ± 4,5	-	-		-	-	
P.C.	-	-	47 ± 4,5	64 ± 4,2	0,001	86 ± 10,8	86 ± 2,5	
ATP **	-	-	56 ±12,1	80 ± 8		-	-	
ADP ***	-	-	26 ± 7,3	50 ± 6	0,01	46 ± 7,3	64 ± 1,4	0,01
U + G ****	-	-	50 ± 7,5			91 ± 7	-	
"Phosphate résiduel"	-	-	-	-	-	-	-	-
P organique labile (somme)	-	-	38 ± 5,3	58 ± 9,7	0,01			

* : P se rapporte à la somme des expériences (temps d'incubation: 10 minutes et 30 minutes); les valeurs de P supérieures à 0,05 n'ont pas été retenues.

** : activité spécifique du groupe terminal de l'ATP. *** : activité spécifique du groupe terminal de l'ADP.

**** : somme des uridine et guanosine phosphates: activité spécifique des groupes phosphates labiles dans le cas où seuls UTP et GTP sont présents.

TABLEAU IX : Influence de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat normal en présence de substrat (glucose 2 mg/ml).

	Activité spécifique (% P extracellulaire)		Activité spécifique (% P intracellulaire)			Activité spécifique (% P terminal de l'ATP)		
	A - Temps d'incubation : 10 minutes							
Insuline 10 µg/ml Nbre expériences	0 2	+ 2	0 2	+ 2	P*	0 3	+ 3	P*
P.I. intracellulaire	5,6 ± 0,6	4,6 ± 0,5	-	-		-	-	
P.C.	-	-	49 ± 1,8	72 ± 2,5	0,001	93 ± 8	104 ± 1	
ATP **	-	-	58 ± 1,0	70 ± 3,0		-	-	
ADP ***	-	-	21 ± 2,0	39 ± 1,0	0,01	39 ± 2,8	54 ± 2,1	0,05
U + G ****	-	-	47 ± 9,0	69 ± 5,8		75 ± 9	95 ± 2,9	
"Phosphate résiduel"	-	-	52 ± 10,4	65 ± 10,2		83 ± 11	89 ± 17	
	B - Temps d'incubation : 30 minutes							
Insuline 10 µg/ml Nbre expériences	0 2	+ 2	0 2	+ 2	P*	0 2	+ 2	P*
P.I. intracellulaire	19,3	18,3± 4	-	-		-	-	
P.C.	-	-	63 ± 7	84	0,001	79 ± 1,3	102	
ATP **	-	-	80 ± 10	83 ± 6		-	-	
ADP ***	-	-	46 ± 6,2	57 ± 2,0	0,01	59 ± 14,7	71 ± 5,3	0,05
U + G ****	-	-	71 ± 1,0	75 ± 9		90 ± 10	92 ± 8	
"Phosphate résiduel"	-	-	-	-		-	-	
P organique labile (somme)	-	-	53 ± 2,1	70 ± 2,9	0,01			

* : P se rapporte à la somme des expériences (temps d'incubation: 10 minutes et 30 minutes); les valeurs de P supérieures à 0,05 n'ont pas été retenues.

** : activité spécifique du groupe terminal de l'ATP. *** : activité spécifique du groupe terminal de l'ADP.

**** : somme des uridine et guanosine phosphates: activité spécifique des groupes phosphates labiles dans le cas où le UTP + GTP sont présents.

minéral intracellulaire ou du phosphate terminal de l'ATP dans le diaphragme de rat normal pour deux temps différents d'incubation en présence de ^{32}P.

Ces résultats permettent de formuler les conclusions suivantes:

- la vitesse de pénétration du phosphate minéral extracellulaire dans le tissu est pratiquement constante entre 0 et 30 minutes. L'insuline provoque une légère diminution de l'activité spécifique du phosphate minéral intracellulaire qui pourrait être due, soit à une légère diminution de la vitesse de pénétration du phosphate extracellulaire, soit à une incorporation plus rapide dans les composés phosphorylés organiques. Cette action de l'insuline, qui n'est d'ailleurs pas statistiquement significative, n'a pas été étudiée en détail.

- le marquage de la somme des phosphates organiques labiles rapporté à celui du phosphate minéral intracellulaire est très augmenté sous l'influence de l'insuline. Cette augmentation est d'environ 55% en absence de glucose et de 32% en présence de glucose. Elle est statistiquement significative.

- après 10 minutes d'incubation, la phosphocréatine est en équilibre isotopique avec le phosphate terminal de l'ATP, cet équilibre n'est pas entièrement conservé au bout de 30 minutes.

- l'effet de l'insuline sur le marquage du phosphate de la phosphocréatine et du phosphate terminal de l'ATP est d'environ 35 à 45 % en absence de glucose et de 30 à 40 % en présence de glucose.

- il n'est pas possible de mettre en évidence un effet de l'insuline sur le marquage du phosphate terminal de l'ATP des diaphragmes incubés 30 minutes en présence de glucose car, à ce moment, chez le témoin comme chez le traité, ce groupe est en équilibre isotopique avec le phosphate minéral intracellulaire. Dans ces conditions, il n'est pas possible de mettre en évidence une forte accélération de sa vitesse de renouvellement. Le glucose provoque une nette augmentation du marquage du phosphate de la phosphocréatine et du phosphate terminal de l'ATP.

- l'augmentation de la radioactivité spécifique de l'ADP sous l'influence de l'insuline est de 70 à 90%. Cette augmentation semble tout à fait indépendante de la présence de glucose dans le milieu d'incubation et diminue le désiquilibre entre les marquages des deux groupes labiles de l'ATP.

- la quantité des uridine et guanosine nucléotides contenus dans le diaphragme étant extrêmement faible, il en résulte une incertitude dans le calcul de leur activité spécifique. Il semble malgré tout que l'insuline augmente le marquage de cette fraction non seulement par rapport au phosphate minéral intracellulaire, mais aussi par rapport au phosphate terminal de l'ATP. L'influence du glucose sur le marquage de cette fraction semble parallèle à son effet sur le marquage du groupe terminal de l'ATP.

- les activités spécifiques du "phosphate résiduel" ont été dans l'ensemble très variables. Sur cette fraction, l'effet du glucose semble prépondérant et tend à l'équilibrer avec le phosphate terminal de l'ATP.

Les résultats obtenus chez le rat normal sont résumés dans la figure 4 qui indique pour les deux temps d'incubation de 0 et 30 minutes, en présence ou non de glucose, l'influence de l'insuline sur le marquage de la phosphocréatine, des deux différents groupes labiles de l'ATP et de la somme des uridine et guanosine phosphates.

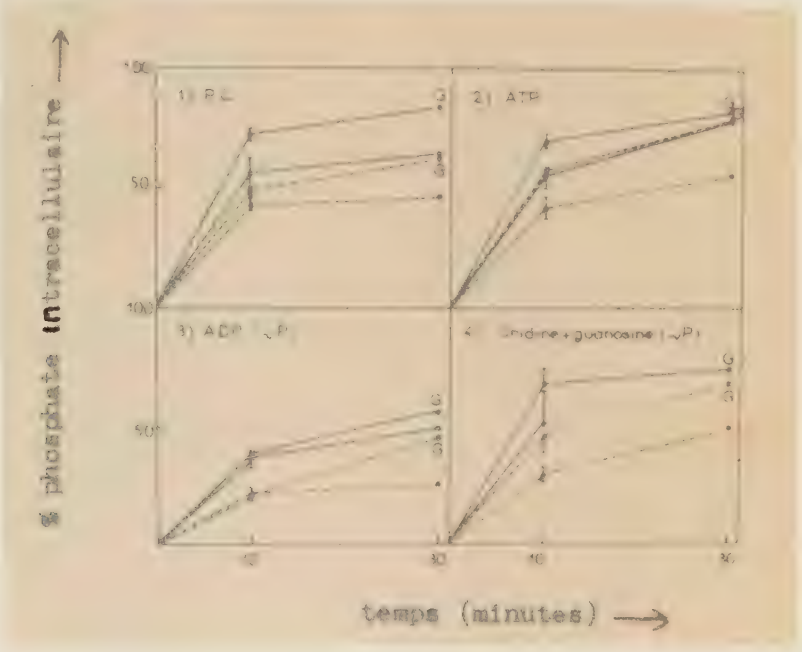


Figure 4: Action de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme isolé de rat.

---- : sans insuline
——— : avec insuline (10 µg/ml)
G : avec glucose
barres verticales: ± erreur standard sur la moyenne.

d) Vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme de rat hypophysectomisé.

Comme le montre le Tableau X, l'action de l'insuline est différente en présence et en absence de substrats.

- En l'absence de substrats (Tableau X-A), l'augmentation de la vitesse de renouvellement des phosphates, provoquée par l'insuline, s'exerce presque exclusivement sur le second groupe de l'ATP (+ 130%) qui atteint presque l'équilibre isotopique avec le phosphate terminal de l'ATP. L'augmentation de la vitesse de renouvellement des autres composés phosphorylés est peu importante (ATP + 15%). Le groupe phosphorylé terminal de l'ATP étant le précurseur du marquage des autres phosphates organiques, et en particulier du phosphate labile de l'ADP, une augmentation du marquage de ce groupe reflète, dans une certaine mesure, une augmentation de la vitesse de renouvellement du phosphate terminal de l'ATP.

Le marquage de la phosphocréatine est légèrement inférieur à celui du groupe terminal de l'ATP.

- L'addition de substrats (Tableau X-B) au diaphragme de rat hypophysectomisé, modifie le sens de l'action de l'insuline qui augmente spécifiquement le marquage du phosphate terminal de l'ATP (+ 55%) et non plus celui de son second groupe labile comme précédemment.

L'augmentation de la radioactivité spécifique des autres phosphates organiques sous l'influence de l'insuline est parallèle à l'augmentation de la radioactivité spécifique du phosphate terminal de l'ATP.

- Si l'on étudie l'action de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme de rat hypophysectomisé préalablement traité par l'hormone de croissance antéhypophysaire, (Tableau XI), nous constatons que cette action est identique en présence et en absence de substrats. L'effet principal de l'insuline porte dans les deux cas sur le phosphate terminal de l'ATP, le marquage des autres phosphates organiques augmente sous l'influence de l'insuline parallèlement au marquage de l'ATP. L'effet de l'insuline sur l'ATP et sur le marquage total de la somme des phosphates organiques labiles est statistiquement significatif.

TABLEAU X: Influence de l'insuline sur la vitesse de renouvellementdes fractions phosphates du diaphragme isolé du rat hypophysectomisé en absence et en présence de substrats; temps d'incubation 10 minutes.

	Activité spécifique (% P extracellulaire)		Activité spécifique (% P intracellulaire)			Activité spécifique (% P terminal de l'ATP)		
	A - Sans substrats							
Insuline 10 µg/ml	0	+	0	+	P *	0	+	P *
Nbre expériences	2	2	2	2		4	2	
P.I. intracellulaire	3,8 ± 0,5	4,4 ± 0,05	-	-		-	-	
P.C.	-	-	53 ± 5	62 ± 4		81 ± 5	90 ± 3	
ATP **	-	-	60 ± 2	69 ± 7		-	-	
ADP ***	-	-	25 ± 3	58 ± 4	0,001	47 ± 4	85 ± 3	0,001
U + G ****	-	-	33 ± 6	42 ± 9		56 ± 4	63	
"Phosphate résiduel"	-	-	33 ± 5	39 ± 2		39	58 ± 9	
P organique labile (somme)	-	-	37 ± 6,7	62 ± 7,1	0,05	-	-	
	B - Glucose (2 mg/ml) + β-hydroxybutyrate (2 mg/ml)							
Insuline 10 µg/ml	0	+	0	+	P *	0	+	P *
Nbre expériences	3	3	3	3		5	4	
P.I. intracellulaire	5,0 ± 0,5	4,8 ± 0,2	-	-		-	-	
P.C.	-	-	43 ± 5	69 ± 10	0,001	92 ± 4	97 ± 8	
ATP **	-	-	45 ± 4	69 ± 8		-	-	
ADP ***	-	-	23 ± 2	33 ± 6	0,05	53 ± 2	53 ± 7	
U + G ****	-	-	33 ± 4	47 ± 3		69 ± 4	70 ± 9	
"Phosphate résiduel"	-	-	36 ± 8	60 ± 4		69 ± 6	74 ± 5	
P organique labile (somme)	-	-	32 ± 4	48 ± 6,9	0,01	-	-	

* : les valeurs de P supérieures à 0,05 n'ont pas été retenues.

** : activité spécifique du groupe terminal de l'ATP. *** : activité spécifique du groupe terminal de l'ADP.

**** : somme des uridine et guanosine phosphates: activité spécifique des groupes phosphates labiles dans le cas où

TABLEAU XI: Influence de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé traité par l'hormone de croissance en présence ou en absence de substrats (Hormone de croissance 2 x 250 µg), temps d'incubation 10 minutes.

	Activité spécifique (% P extracellulaire)		Activité spécifique (% P intracellulaire)			Activité spécifique (% P terminal de l'ATP)		
	A - s a n s s u b s t r a t s							
Insuline 10 µg/ml	0	+	0	+	P*	0	+	P*
Nbre expériences	2	2	2	2		2	2	
P.I. intracellulaire	3,7 ± 0,3	3,9 ± 0,3	-	-		-	-	
P.C.	-	-	54 ± 4	65 ± 1		91 ± 8	82 ± 5	
ATP **	-	-	59 ± 7	78 ± 4	0,001	-	-	
ADP ***	-	-	34 ± 0,2	42 ± 6		59 ± 7	52 ± 5	
U + G ****	-	-	44 ± 5	47 ± 8		73 ± 1,0	52 ± 7	
"Phosphate résiduel"	-	-	32 ± 9	64 ± 6		-	81 ± 4	
P organique labile (somme)	-	-	48 ± 0	58 ± 4,5	0,01	-	-	
	B - G l u c o s e (2 mg/ml) + β - h y d r o x y b u t y r a t e (2 mg/ml)							
Insuline 10 µg/ml	0	+	0	+	P*	0	+	P*
Nbre expériences	3	3	3	3		4	4	
P.I. intracellulaire	4,2± 1,2	4,2 ± 0,5	-	-		-	-	
P.C.	-	-	56 ± 7	69 ± 3		95 ± 2	83 ± 8	
ATP **	-	-	60 ± 8	88 ± 8	0,001	-	-	
ADP ***	-	-	39 ± 6	46 ± 2		68 ± 4	51 ± 2	
U + G ****	-	-	63 ± 7	72 ± 12		102 ± 9	82 ± 9	
"Phosphate résiduel"	-	-	-	62 ± 1		-	64 ± 4	
P organique labile (somme)	-	-	53,5± 5,8	66,3± 2,6	0,01	-	-	

* P se rapporte à la somme des expériences (avec et sans substrats); les valeurs de P supérieures à 0,05 n'ont pas été retenues.

** activité spécifique du groupe terminal de l'ATP. *** : activité spécifique du groupe terminal de l'ADP.

**** somme des uridine et guanosine phosphates: activité spécifique des groupes phosphates labiles dans le cas où seuls, UTP et GTP sont présents.

2 - Etude de l'action de l'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme de rat hypophysectomisé.

L'action de l'hormone de croissance sur le diaphragme du rat hypophysectomisé est identique en absence et en présence de substrats (Tableau XII-A et B).

La phosphocréatine est presque en équilibre isotopique avec l'ATP, le marquage du groupe phosphorylé terminal de ce composé n'est pas modifié par le traitement à l'hormone de croissance, d'une manière significative.

La radioactivité spécifique du phosphate labile de l'ADP est augmentée d'une façon significative par l'hormone de croissance en absence ou en présence de substrats aussi bien par rapport au marquage du phosphate minéral intracellulaire (+ 30 à 40%) que par rapport au marquage du phosphate terminal de l'ATP (+ 30 à 50%). La radioactivité spécifique de la somme des uridine et guanosine phosphates est également augmentée sous l'influence de l'hormone de croissance, en l'absence de substrats, aussi bien par rapport à la radioactivité spécifique du phosphate intracellulaire (+ 33%) que par rapport à celle du phosphate terminal de l'ATP (+ 33%). Cette augmentation est encore plus nette en présence de glucose où elle est respectivement de + 94% et de + 48%.

Si l'on étudie l'influence d'injections d'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des fractions phosphates du diaphragme de rat hypophysectomisé, en présence d'insuline (Tableau XIII), on voit que l'hormone de croissance ne modifie pas considérablement le marquage des différents composés. En l'absence de substrats, l'hormone de croissance supprime l'équilibre isotopique entre les deux phosphates labiles de l'ATP; En présence de substrats l'action de l'hormone de croissance s'exerce essentiellement sur l'ADP (+ 39% et + 9% par rapport au phosphate minéral intracellulaire et au phosphate terminal de l'ATP) et sur la somme des uridine et guanosine nucléotides dont le marquage est augmenté respectivement de + 28% et de + 33% par rapport au phosphate minéral intracellulaire et au phosphate terminal de l'ATP.

TABLEAU XII: Influence d'injections d'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, temps d'incubation 10 minutes.

	Activité spécifique (% P extracellulaire)		Activité spécifique (% P intracellulaire)			Activité spécifique (% P terminal de l'ATP)		
			A - Sans substrats					
Hormone de croissance (2 x 250 µg)	0	+	0	+	P *	0	+	P *
Nbre expériences	2	2	2	2		4	2	
P.I. intracellulaire	3,8 ± 0,5	3,7 ± 0,3	-	-		-	-	
P.C.	-	-	53 ± 5	54 ± 4		81 ± 5	91 ± 8	
ATP **	-	-	60 ± 2	59 ± 7		-	-	
ADP ***	-	-	25 ± 3	34 ± 0,2	0,05	47 ± 4	59 ± 7	
U + G ****	-	-	33 ± 6	44 ± 5	0,05	56 ± 4	73 ± 1	0,001
"Phosphate résiduel"	-	-	33 ± 5	32 ± 9		39	-	
			B - Glucose (2 mg/ml) + β-hydroxybutyrate (2 mg/ml)					
Hormone de croissance (2 x 250 µg)	0	+	0	+	P *	0	+	P *
Nbre expériences	3	3	3	3		5	4	
P.I. intracellulaire	5,0 ± 0,5	4,2 ± 1,2	-	-		-	-	
P.C.	-	-	43 ± 5	56 ± 7		92 ± 4	95 ± 2	
ATP **	-	-	45 ± 4	60 ± 8		-	-	
ADP ***	-	-	23 ± 2	39 ± 6	0,05	53 ± 2	68 ± 4	0,01
U + G ****	-	-	33 ± 4	63 ± 7	0,05	69 ± 4	102 ± 9	0,001
"Phosphate résiduel"	-	-	36 ± 8	-		69 ± 6	-	

* P se rapporte à la somme des expériences (avec et sans substrats); les valeurs de P supérieures à 0,05 n'ont pas été retenues.

** activité spécifique du groupe terminal de l'ATP. *** : activité spécifique du groupe terminal de l'ADP.

**** somme des uridine et guanosine phosphates: activité spécifique des groupes phosphates labiles dans le cas où seuls, ATP et GTP sont présents.

TABLEAU XIII: Influence d'injections d'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des fractions phosphates du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, en présence d'insuline (10 µg/ml), temps d'incubation 10 minutes.

	Activité spécifique (% P extracellulaire)		Activité spécifique (% P intracellulaire)		Activité spécifique (% P terminal de l'ATP)	
	A - Sans substrats					
Hormone de croissance (2 x 250 µg)	0	+	0	+	0	+
Nbre expériences	2	2	2	2	2	2
P.I. intracellulaire	4,4 ± 0,05	3,9 ± 0,3	-	-	-	-
P.C.	-	-	62 ± 4	65 ± 1	90 ± 3	82 ± 5
ATP *	-	-	69 ± 7	78 ± 4	-	-
ADP **	-	-	58 ± 4	42 ± 6	85 ± 3	52 ± 5
U + G ***	-	-	42 ± 9	41 ± 8	63	52 ± 7
"Phosphate résiduel"	-	-	39 ± 2	64 ± 6	58 ± 9	81 ± 4
	B - Glucose (2 mg/ml) + β - hydroxybutyrate (2 mg/ml)					
Hormone de croissance (2 x 250 µg)	0	+	0	+	0	+
Nbre expériences	3	3	3	3	4	4
P.I. intracellulaire	4,8 ± 0,2	4,2± 0,5	-	-	-	-
P.C.	-	-	69 ± 10	69 ± 3	97 ± 8	83 ± 8
ATP *	-	-	69 ± 8	88 ± 8	-	-
ADP **	-	-	33 ± 6	46 ± 2	53 ± 7	51 ± 2
U + G ***	-	-	47 ± 3	72 ± 12	70 ± 9	82 ± 9
"Phosphate résiduel"	-	-	60 ± 4	62 ± 1	74 ± 5	64 ± 4

* Activité spécifique du groupe terminal de l'ATP. ** Activité spécifique du groupe terminal de l'ADP.
*** Somme des uridine et guanosine phosphates: activité spécifique des groupes phosphates labiles dans le cas où seuls, UTP et GTP sont présents.

B - ETUDE DU TAUX ET DE LA VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES D'UN MUSCLE LISSE: L'UTERUS. INFLUENCE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE L'ANIMAL.

I - INFLUENCE DE L'OESTRADIOL ET DE LA PROGESTERONE SUR LE TAUX DES FRACTIONS PHOSPHORYLEES ET DE LA PHOSPHOCREATINE DANS L'UTERUS DE RAT.

L'étude de l'influence de l'oestradiol et de la progestérone sur le taux des fractions phosphorylées et de la phosphocréatine de l'utérus de rat a été faite, soit sur des organes congelés dans l'azote liquide dès leur dissection, soit sur des organes non congelés.

1 - Utérus congelés.

Les résultats sont résumés dans le Tableau XIV. Les différentes fractions sont séparées, comme nous l'avons vu plus haut, suivant leur vitesse d'hydrolyse. La phosphocréatine, dosée suivant la méthode d'Ennor et Rosenberg (194) est exprimée en µg de phosphore.

Chez les rats impubères témoins, les rats adultes et les rats ovariectomisés une importante fraction (50 à 75%) du phosphate des esters labiles est constituée par le phosphate de la phosphocréatine. Le taux de la phosphocréatine varie peu sous l'influence de l'oestradiol et de la progestérone, en revanche, l'oestradiol provoque une augmentation très importante des esters labiles dosés par la méthode de Lowry et Lopez* (186) (+ 150%) et des phosphates 7-minutes (+ 63%), ainsi qu'une diminution du phosphate minéral vrai (-40%).

Quand on injecte simultanément de l'oestradiol et de la progestérone, le niveau du phosphate 7 minutes reste voisin de celui obtenu chez les animaux injectés

* La forte augmentation, sous l'influence de l'oestradiol et de la progestérone, des phosphates labiles dosés par la méthode de Lowry et Lopez pose un problème qui n'a pu être résolu au cours du présent travail. En effet, la phosphocréatine ne constitue que 20 à 30% de cette fraction chez le rat traité à l'oestradiol et 13 à 25% chez le rat traité à l'oestradiol et à la progestérone. Le reste des phosphates labiles est constitué par un ou plusieurs composés dont la vitesse d'hydrolyse est très supérieure à celle de la phosphocréatine. L'existence d'un inhibiteur qui ralentirait le développement de la coloration obtenue par cette méthode pourrait évidemment expliquer ces résultats: cette hypothèse a cependant pu être écartée grâce à des dosages effectués après addition de quantités connues d'orthophosphate minéral, et dont le détail n'est pas présenté ici.

d'oestradiol seul, les esters labiles au contraire sont fortement augmentés (+ 280% si l'on compare avec les animaux témoins) et le phosphate minéral vrai diminué (-60% si l'on compare avec les animaux témoins). Toutes ces variations sont significatives $P < 0,01$.

2 - Utérus non congelés.

Si nous comparons les résultats obtenus sur l'utérus après congélation (Tableau XIV) à ceux obtenus en utilisant des utérus non congelés (Tableau XV), nous voyons quelle est l'influence de la congélation sur les différentes fractions phosphorylées de l'utérus suivant l'état physiologique de l'animal. La congélation diminue, d'une façon significative, le taux des phosphates labiles et de la phosphocréatine de l'utérus. Elle n'a cependant, pratiquement, pas d'influence sur le taux des esters très labiles dosés selon la méthode de Lowry et Lopez, et dont la nature exacte, chez le rat traité à l'oestradiol seul ou additionné de progestérone, n'a pas été étudiée comme nous venons de l'indiquer.

Cette action de la congélation est beaucoup plus marquée dans le cas des animaux impubères que dans les autres cas. Il est possible que chez les animaux impubères dont les structures cellulaires sont plus fragiles, les effets de la congélation soient plus brutaux et qu'au cours de la décongélation partielle, inévitable lors du broyage, une partie des nucléotides soit hydrolysée par les phosphatases libérées. Cette fragilité des utérus des rats impubères, qui entraîne, même sur les organes non congelés, une hydrolyse des nucléotides conduit à prendre au cours de la dissection des précautions rigoureuses. Si la congélation a une influence sur le taux des phosphates labiles de l'utérus, le sens des variations dues aux traitements hormonaux est le même qu'il s'agisse d'utérus congelés ou non.

L'oestradiol augmente le taux des phosphates labiles et la progestérone augmente spécifiquement le taux des esters très labiles.

Nous avons poursuivi l'étude des composés phosphorylés de l'utérus et du diaphragme uniquement sur des organes non congelés.

TABLEAU XIV: Influence de l'oestradiol et de la progestérone sur le taux des fractions phosphorylées et de la phosphocréatine dans l'utérus de rat (organes congelés).

Etat physiologique	Nombre		Poids moyen		Phosphate minéral vrai	Phosphate 0 minute	P.C. (P)	Esters labiles	Phosphate 7 minutes	Phosphate 180 minutes	Phosphate total acidosoluble
	Rats	Exp.	Rats (g)	Utérus (mg)							
Impubères	49	5	37	19,6	20,3±0,96	23,5±1,06	1,1±0,1	3,6±0,2	8,4±1,5	15,9	93,5±4,1
Impubères traités par 2 x 10 µg oestradiol	34	7	40	96	12,4±0,85	19,9±0,7	1,4±0,05	7,6±0,98	13,4±0,97	25,4±0,9	68,2±4,5
Impubères traités par 2 x 10 µg oestradiol 2 x 100 µg progestérone	36	8	44	96	8,4±0,73	21,4±0,7	1,7±0,26	12,9±0,6	13,7±0,8	24 ±2,2	67 ±1,2
Adultes	7	6	206	291	18,6±1	22,7±1,2	-	3,9±1	7,1±1,6	-	-
Ovariectomisés	16	9	222	84	13,4±0,5	21,2±1	4	7,4±1	9,3±0,8	19,7±1,1	48,3±1,5

TABLEAU XV: Influence de l'oestradiol et de la progestérone sur le taux des fractions phosphorylées et de la phosphocréatine dans l'utérus de rat (organes non congelés).

Etat physiologique	Nombre		Poids moyen		Phosphate minéral vrai	Phosphate 0 minute	P.C. (P)	Esters labiles	Phosphate 7 minutes
	Rats	Exp.	Rats (g)	Utérus (mg)					
Impubères	27	3	35±3	20,2	15,5±1,2	20,5	3,76±0,1	5 ±0,9	13,2±0,85
Impubères traités par 2 x 10 µg oestradiol	11	3	37±2,7	80,6	12,4	19,8	2,1 ±0,1	7,1	17,9±1,7
Impubères traités par 2 x 10 µg oestradiol 2 x 100 µg progestérone	10	3	39±3,5	91,3	7,2±1,2	17,2	2,6 ±0,3	10,2±0,6	20 ±0,09
Ovariectomisés	14	3	174±14	80,4	11,5±0,8	16,8	2,4 ±0,13	5,3±1,2	8,2±0,5

II - INFLUENCE DE L'OESTRADIOL ET DE LA PROGESTERONE SUR LE TAUX DES NUCLEOTIDES DE L'UTERUS DE RAT IMPUBERE OU OVARIECTOMISE.

Les Tableaux XVI et XVII résument les résultats obtenus chez le rat impubère et le rat ovariectomisé.

1 - ATP.

L'oestradiol provoque une augmentation significative de l'ATP chez le rat impubère. Cette augmentation est encore plus importante chez le rat ovariectomisé quelles que soient les doses relatives d'oestradiol et de progestérone. La teneur en ATP, aussi bien chez les rats impubères que chez les rats ovariectomisés, reste la même que la teneur en ATP des animaux injectés d'oestradiol seul. L'ATP a été dosé simultanément par chromatographie ou par la méthode de Strehler et Totter. La concordance entre les deux méthodes est parfaite.

2 - ADP.

L'oestradiol et la progestérone ne modifient pas le taux d'ADP chez le rat impubère et chez le rat ovariectomisé. Cependant, il est très difficile de connaître le taux exact de l'ADP dans un tissu. Harth et Mandel (204) ont montré que dans le cerveau notamment, le taux d'ADP variait considérablement selon le mode de sacrifice de l'animal et le prélèvement de l'organe.

3 - Somme des uridine et guanosine nucléotides.

Le taux de l'ensemble des uridine et guanosine nucléotides est augmenté d'une façon encore plus importante que l'ATP sous l'influence de l'oestradiol chez le rat impubère et chez le rat ovariectomisé. L'addition de progestérone ne modifie pas le taux de cette fraction mais en modifie la composition. Le Tableau XVIII montre les teneurs en uridine et guanosine phosphates de l'utérus de rat impubère traité à l'oestradiol et à la progestérone. Les composés suivants ont été mis en évidence: GTP, GDP, UTP, UMP, UDPAG, L'UMP dérive, comme Tsuboï l'a montré (38), des uridine diphospho-sucres qui, instables en milieu alcalin, sont hydrolysés par le solvant utilisé au cours de la deuxième chromatographie. Il ne peut s'agir d'UMP libre du muscle qui aurait été révélé au cours de la première chromatographie. Les guanosine et les uridine phosphates représentent respectivement 10 à 15% et 30 à 35% des adénosine phosphates de

TABLEAU XVI: Nucléotides de l'utérus de rats impubères traités ou non à l'oestradiol et à la progestérone.

Traitement	Nombre		Poids moyen		ATP		ADP	AMP	IMP	DPN	(U + G)**
	Essais	Rats	Rats (g)	Utérus (mg)	Luminescence*	Chromatographie					
Aucun	16	225	39	18,7	10,6 ± 1,1 P < 0,01	11,2 ± 0,6 P < 0,001	5 ± 0,32	0,94±0,28	0,84±0,23 P = 0,05	2,75±0,33	5,94±0,73 P < 0,001
2 x 10µg benzoate oestradiol	19	72	45	87	15,1 ± 0,9	14,7 ± 0,34	4,8 ± 0,2	0,8 ±0,26	1,65± 0,3	2,4 ±0,27	9,73±0,52
2 x 10µg benzoate oestradiol + 2 x 10µg progestérone	4	37	40	83	18,5 ± 1	15,5 ± 1,05	4,4 ± 0,76	0,6 ±0,48	-	-	-
2 x 10µg benzoate oestradiol + 3 x2000µg progestérone	2	6	51	73	-	13,8 ± 0,5	5,9 ± 0,1	0	1,5 ±0,1	2,5 ±0,1	9,2 ±0,2

Valeurs exprimées en µg de phosphore total dû aux nucléotides par 100 mg de tissu frais ± erreur standard sur la moyenne.

* Méthode de Strehler et Totter basée sur la luminescence des "fireflies"

** Somme des uridine et guanosine phosphates.

TABLEAU XVII: Nucléotides de l'utérus de rats ovariectomisés traités ou non à l'oestradiol, comparés à ceux de l'utérus de rats adultes.

Etat physiologique	Nombre Essais	Nombre Rats	Poids moyen Rats (g)	Poids moyen Utérus (mg)	ATP	ADP	AMP	IMP	DPN	(U + G)*
1. Rats ovariectomisés à l'état adulte										
Aucun traitement	3	14	237±26	117	7,1 ± 0,24	2,95±0,45	-	-	-	-
					P = 0,001					
2 x 10µg benzoate d'oestradiol	3	3	205±3	249	11,3 ± 0,42	3,2 ±0,4	-	-	-	-
2. Rats ovariectomisés à l'âge de 6 semaines environ										
Aucun traitement	2	5	263±27	30	5,05 ± 0	3,24±0,55	0	0,23	2,6	2,6 ± 0,47
					P<0,001					
2 x 10µg benzoate d'oestradiol	2	2	265±15	142	11,2 ± 1,8	4,5 ±0,5	0	1,44	2,75	8,6 ± 2,6
3. Rats adultes n'ayant subi aucun traitement										
	5	9	205±31	456	6,06±0,67	3,2 ±0,48	1,26±0,23	-	-	-

Valeurs exprimées en µg de phosphore total dû aux nucléotides, par 100 mg de tissu frais ± erreur standard sur la moyenne.

* (U + G) = somme des uridine et guanosine phosphates.

l'utérus. La progestérone provoque une légère augmentation des guanosine phosphates et une forte augmentation de l'UDPAG, aux dépens de l'UDP et de l'UTP.

TABLEAU XVIII: Uridine et guanosine nucléotides dans l'utérus de rats traités ou non à l'oestradiol et à la progestérone.

Etat physiologique et traitement	Nombre de rats	Poids moyen		GTP	GDP	UTP	UDP	UMP*	UDPAG**
		Rats (g)	Utérus (mg)						
Impubères 5 x 10µg benzoate oestradiol	10	52	143	1,64	0,65	2,82	1,35	1,23	1,30
Impubères 2 x 10µg benzoate oestradiol + 3 x 2.000µg progestérone	15	40	77	1,94	1,01	2,25	0,92	1,20	2,08

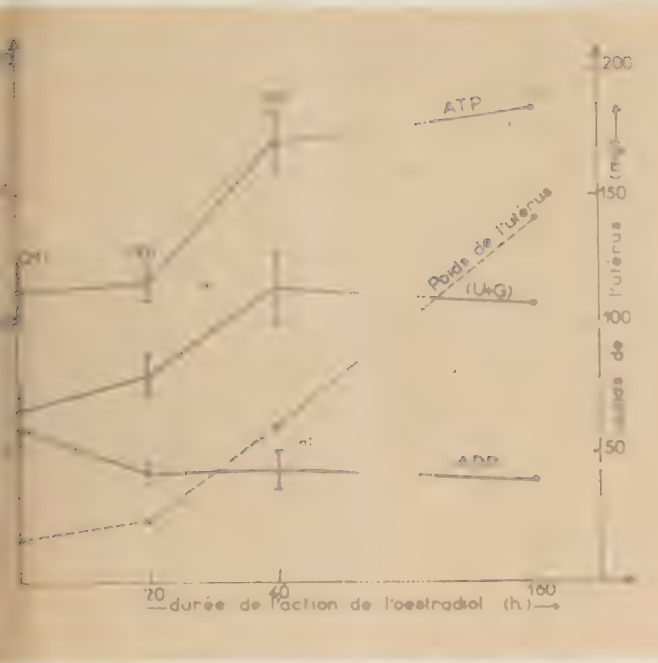
* UMP dû à l'hydrolyse des uridine diphosphohexoses au cours de la 2ème chromatographie en milieu basique.

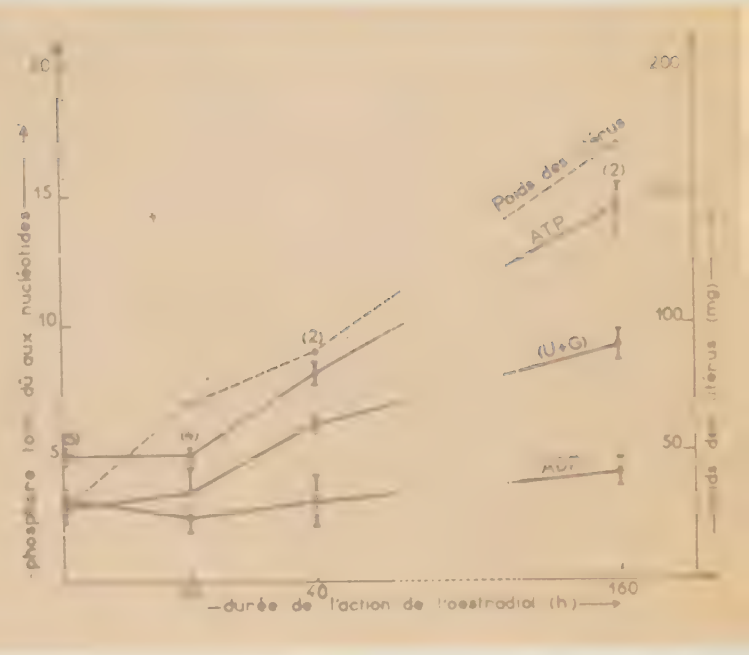
** UDPAG = uridine diphosphoacétylglucosamine.

Les valeurs des nucléotides sont exprimées en µg de phosphore total/100 mg de tissu frais.

L'ensemble de ces résultats montre que l'augmentation du taux des nucléotides chez l'animal impubère ou ovariectomisé sous l'influence de l'oestradiol correspond à l'augmentation des phosphates labiles provoquée par cette hormone dans l'utérus. Le pourcentage d'augmentation du taux de l'ATP et de la somme des uridine et guanosine nucléotides est plus fort chez le rat ovariectomisé que chez le rat impubère chez qui pourrait exister une certaine fonction ovarienne.

Nous avons étudié simultanément les variations du poids de l'utérus et de sa teneur en nucléotides sous l'influence d'injections d'oestradiol, selon les doses et la durée de l'action. Les résultats obtenus sont rapportés figure 5 (rats impubères) et figure 6 (rats ovariectomisés).





igure 5: Cinétique des variations des ucléotides et du poids de l'utérus de rats mpubères sous l'influence de l'oestradiol. ats traités 20 h. et 40 h.; une injection e 10 µg oestradiol, (poids moyen 33 g) ats traités 160 h., 5 injections de 10 µg estradiol, (poids moyen 57 g)

Figure 6: Cinétique des variations des nucléotides et du poids de l'utérus de rats ovariectomisés à 6 semaines, sous l'influence de l'oestradiol. Les rats sont utilisés 12 semaines après l'ovariectomie (poids moyen 257g) Rats traités 20 h. et 40 h.; une injection de 20 µg oestradiol.
Rats traités 160 h., 5 injections de 20 µg d'oestradiol.

(U + G) : somme des uridine et guanosine phosphates
Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats.

L'augmentation de poids de l'utérus est déjà importante 20 heures après l'injection, alors que le taux des nucléotides reste inchangé aussi bien chez les rats impubères que chez les rats ovariectomisés. Entre 20 heures et 40 heures, l'augmentation du poids de l'utérus s'accompagne d'une forte augmentation du taux de l'ATP, et de l'ensemble des uridine et guanosine phosphates. Une action prolongée de l'oestradiol augmente de façon presque linéaire le poids de l'utérus; le taux des nucléotides restant stationnaire chez les impubères et continuant à augmenter dans le cas des animaux ovariectomisés.

III - INFLUENCE DE L'OESTRADIOL ET DE LA PROGESTERONE SUR LA VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES DE L'UTERUS DE RAT.

1 - Vitesse de renouvellement des composés phosphorylés de l'utérus in vivo.

Nous avons étudié in vivo la pénétration du phosphate minéral dans l'utérus et la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés chez le rat traité ou non par l'oestradiol et la progestérone.

a) Pénétration du phosphate minéral dans l'utérus.

Nous avons vu plus haut qu'il était très difficile de mesurer in vivo l'espace extracellulaire de l'utérus et que les valeurs trouvées par différents auteurs varient considérablement suivant la méthode employée et l'état physiologique de l'animal. Ainsi il est impossible de déterminer avec précision la radioactivité spécifique du phosphate minéral intracellulaire. Cependant, l'étude de cette pénétration in vitro, qui est rapportée plus loin, a montré qu'à chaque instant, dans l'utérus, le phosphate terminal de l'ATP est en équilibre isotopique avec le phosphate minéral intracellulaire. Il semble donc raisonnable d'admettre qu'il en est de même in vivo. S'il en était ainsi, l'activité spécifique du groupe terminal de l'ATP, exprimée en pour cent de l'activité spécifique du phosphate minéral du sang, mesurerait la vitesse de pénétration du phosphate minéral dans l'espace intracellulaire. Le Tableau XIX montre que la vitesse de pénétration du phosphate radioactif est fortement augmentée chez le rat ovariectomisé injecté d'oestradiol par rapport au rat ovariectomisé témoin. Cette augmentation de la vitesse de pénétration du phosphate dans l'espace intracellulaire de l'utérus sous l'influence de l'oestradiol in vivo est en contradiction avec les résultats obtenus in vitro dont il sera parlé plus loin. La raison de cette contradiction qui n'a pu être encore déterminée sera discutée.

TABLEAU XIX : Radioactivité spécifique du phosphate terminal de l'ATP en % de la radioactivité spécifique du phosphate minéral extracellulaire.

Etat physiologique	Nbre exp.	Temps * 2 min.	4 min.	10 min.	30 min.	1 h.	2 h.
Ovariectomisés	2	-	-	7,5 ± 1,3	16,5 ± 1	40,5	76 ± 5
Ovariectomisés traités par 2 x 10 µg oestradiol	2	5,71	9,04	17	54 ± 0	92	174

* Temps s'écoulant entre l'injection de phosphate radioactif et le sacrifice de l'animal.

b) Vitesse de renouvellement des nucléotides.

Pour les raisons que nous avons indiquées plus haut dans le cas de l'étude de la vitesse de renouvellement des nucléotides du diaphragme *in vivo*, nous avons exprimé (Tableau XX) les radioactivités spécifiques de l'ADP et de la somme des uridine et guanosine phosphates par rapport à la radioactivité spécifique du phosphate terminal de l'ATP. Les résultats obtenus montrent que pour l'utérus comme pour le diaphragme, l'ADP est, dès les premières minutes s'écoulant après l'injection de phosphate radioactif, en équilibre isotopique avec le phosphate terminal de l'ATP. Cet équilibre est beaucoup plus lent à s'établir pour la somme des uridine et guanosine phosphates, puisqu'il n'est atteint qu'au bout de 40 à 60 minutes chez le rat ovariectomisé. L'injection d'oestradiol augmente la vitesse de renouvellement de cette fraction qui, dans ce cas, est en équilibre isotopique avec le phosphate terminal de l'ATP dix minutes après l'injection de phosphate radioactif. Contrairement à ce qui se passe pour la pénétration dans l'espace intracellulaire, ce dernier résultat, qui indique une accélération de la vitesse de renouvellement des nucléotides guanyliques et uridyliques, est en accord avec les résultats obtenus *in vitro*.

2 - Vitesse de renouvellement des composés phosphorylés de l'utérus *in vitro*.

Comme dans le cas du diaphragme, l'étude *in vitro* de la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés de l'utérus montre que dans ces conditions les échanges entre les différents phosphates des nucléotides et le phosphate intracellulaire sont très ralentis et qu'il est possible de mettre en évidence une influence de l'état physiologique de l'animal sur la vitesse de pénétration du phosphate radioactif dans la cellule de l'utérus et la vitesse de renouvellement des différents phosphates labiles, ce qui n'était qu'imparfaitement possible *in vivo*.

Les Tableaux XXI à XXIII montrent les résultats obtenus avec les utérus de rats ovariectomisés témoins, de rats ovariectomisés injectés de 3 x 25 µg de benzoate d'oestradiol et de rats ovariectomisés injectés de 3 x 25 µg de benzoate d'oestradiol et de 3 x 5.000 µg de progestérone. Les temps d'incubation ont été de 2 minutes, 5 minutes, 10 minutes et 30 minutes pour les rats témoins, de 2 minutes, 5 minutes et 10 minutes pour les rats traités à l'oestradiol, et de 2 minutes et 5 minutes pour les rats traités à l'oestradiol et à la progestérone. La radioactivité spécifique du phosphate intracellulaire est exprimée en pour cent du phosphate extra-

TABLEAU XX: Radioactivité spécifique de l'ADP et de la somme des uridine et guanosine phosphates en pourcentage de la radioactivité spécifique du groupe terminal de l'ATP dans l'utérus de rat normal, ovariectomisé et ovariectomisé injecté d'oestradiol.

Etat physiologique	Nbre rats	Poids moyen Rats (g)	Poids moyen Utérus (mg)		Temps* 2 min.	4 min.	10 min.	20 min.	30 min.	40 min.	1 h.	2 h.
Adultes	4	95	140	ADP	-	-	94 ± 8	120 ± 7	-	105 ± 5	-	-
				(U+G)**	-	-	44 ± 11	70 ± 14	-	93 ± 4	-	-
Ovariectomisés	2	180	25,6	ADP	-	-	88 ± 13	-	94	-	100	105 ± 15
				(U+G)**	-	-	-	-	59	-	77	117 ± 9
Ovariectomisés traités par 2 x10µg oestradiol	2	190	105	ADP	108	130	99	102	-	-	117	100 ± 1
				(U+G)**	61	73	98	81	-	-	116	116 ± 9

* Temps s'écoulant entre l'injection de phosphate radioactif et le sacrifice de l'animal.

** (U+G) = Somme des uridine et guanosine phosphates.

TABLEAU XXI: Teneur et vitesse de renouvellement des nucléotides libres de l'utérus de rats ovariectomisés témoins.

	µg P/100 mg poids frais					Activité spécifique (% P extracell.(E) ou intracell. (I)			
ubation(min.)	2	5	10	30		2	5	10	30
mbre essais	1	2	2	1		1	2	2	1
rats	7	12	10	5		7	12	10	5
ids moyen érus (mg)	27	18	21	18		27	18	21	18
extracell.	1,2	1,2±0,1	1,1±0	1,1		-	-	-	-
intracell.	19,6	22,6±1,4	21,4±1,4	16,3	% E	1,6	5,1±0,5	9,4±0,9	18,1
ATP *	5,0	4,4±2	3,7±0,2	5,0	% I	117	105±19	79±1	96
ADP *	4,5	5,4±0,2	3,9±1,6	4,4	% I	29	31±5	26±0	42
U + G **	4,0	3,5±1	2,6±0	2,3	% I	26	24±2	32±3	77
P + DPN	2,8	2,7	2,6	2,0		-	-	-	-
"résiduel"	12,7	17,3±1,7	13,7	-	% I	9	7,4±0,6	8,4	-

TABLEAU XXII: Teneur et vitesse de renouvellement des nucléotides libres de l'utérus de rats ovariectomisés traités par 3 x 25 µg de benzoate d'oestradiol.

	µg P/100 mg poids frais					Activité spécifique (% P extracell. (E) ou intracell. (I)			
ubation (min.)	2	5	5 ***	10		2	5	5 ***	10
mbre essais	2	3	2	1		2	3	2	1
rats	2	4	2	1		2	4	2	1
ids moyen érus (mg)	138	128	166	101		138	128	166	101
extracell.	0,7±0	0,86±0,04	0,82±0,02	0,90		-	-	-	-
intracell.	17,3±2,1	19,3±1,7	16,1	25	% E	1,1±0,2	2,6±0,13	1,75±0,03	4,8
ATP *	9,7±0,3	11,8±1,1	11,1±1,7	9,3	% I	113±7	97±6	100	99
ADP *	4,3±0,1	4,4±1	5 ±0,1	2,8	% I	29±5	54±7	53 ±6	89
U + G **	6,3±1	9,4±1,6	6,8±1,2	6,7	% I	35±1	36±2	39 ± 1	46
P + DPN	2,2±0,7	2,5±0,1	2,6±0,2	2,8		-	-	-	-
"résiduel"	15 ±2,7	11,6±0,4	-	-	% I	8,4	9,2±0,8	-	-

* La radioactivité spécifique donnée est celle du groupe terminal.
** Somme des phosphates labiles des uridine et guanosine phosphates.
*** Mg^{++} $5,9.10^{-3}$M.

TABLEAU XXIII: Teneur et vitesse de renouvellement des nucléotides libres de l'utérus de rats ovariectomisés traités par 3 x 25 µg de benzoate d'oestradiol et 3 x 5.000 µg de progestérone.

	µg P/100 mg poids frais				Activité spécifique (% P extracell. (E) ou intracell. (I)		
Incubation (min.)	2	5	5 ***		2	5	5 ***
Nombre essais	1	2	1		1	2	1
Nombre rats	1	3	1		1	3	1
Poids moyen utérus (mg)	136,1	101,2	126,3		136,1	101,2	126,3
P extracell.	0,7	0,8 ± 0,03	0,8		-	-	-
P intracell.	21,0	20,5 ± 0,10	17,3	% E	1,2	3,1 ± 0,2	1,9
ATP *	10,0	12,1 ± 1,3	9,4	% I	92	103 ± 5	100
ADP *	4,4	4,7 ± 0,4	4,6	% I	26	43 ± 3	54
U + G **	7,3	8,8 ± 1,1	6,5	% I	27	35 ± 1	30
AMP + DPN	2,9	3,2 ± 1,0	3,6		-	-	-
P "résiduel"	17,8	16,9 ± 0,9	15,1	% I	-	-	14

* La radioactivité spécifique est celle du groupe terminal.

** Somme des phosphates labiles des uridine et guanosine phosphates.

*** Mg^{++} $5{,}9.10^{-3}$M.

cellulaire; les radioactivités de toutes les autres fractions phosphorylées sont exprimées en pour cent du phosphate intracellulaire.

a) Taux des nucléotides dans les organes incubés.

Le taux des nucléotides (ATP, ADP, uridine et guanosine nucléotides) est plus faible dans les organes incubés que dans les organes prélevés directement après la mort de l'animal (Tableaux XVI et XVII). Le taux d'ATP est très diminué (- 30% chez les animaux traités à l'oestradiol ou à la progestérone, -60% chez les animaux ovariectomisés témoins). Le taux des nucléotides reste stationnaire pendant toute la durée de l'incubation.

b) Pénétration du phosphate minéral dans l'espace intracellulaire.

L'activité spécifique du phosphate extracellulaire ne varie pas au cours des

30 premières minutes de l'incubation; dans ces conditions, le rapport des activités spécifiques du phosphate intracellulaire et du phosphate extracellulaire est en première approximation une mesure de la vitesse de pénétration du phosphate minéral dans la cellule. Cette vitesse est constante entre 2 et 10 minutes comme cela est indiqué plus haut à propos de la détermination de l'espace extracellulaire de l'utérus. La comparaison entre les Tableaux XXI et XXII montre que la pénétration est approximativement deux fois plus lente chez les animaux traités à l'oestradiol que chez les animaux ovariectomisés témoins. La contradiction entre ce résultat et celui obtenu in vivo a été mentionnée plus haut.

c) Vitesse de renouvellement des nucléotides.

Les Tableaux XXI à XXIII donnent l'activité spécifique des nucléotides aux divers temps d'incubation en pour cent du phosphate minéral intracellulaire. D'autre part, la figure 7 permet de suivre l'évolution de l'incorporation de la radioactivité dans les deux phosphates labiles de l'ATP et dans les phosphates labiles de la somme des uridine et guanosine nucléotides en pour cent du phosphate minéral extracellulaire. Ceci permet entre autre de suivre l'augmentation pratiquement linéaire de l'incorporation de la radioactivité dans le groupe terminal de l'ATP. Sur cette figure les échelles employées pour les rats témoins et les rats traités à l'oestradiol sont différentes afin d'éliminer les effets dus aux différentes des vitesses de pénétration de ^{32}P, elles sont dans le rapport 2/1.

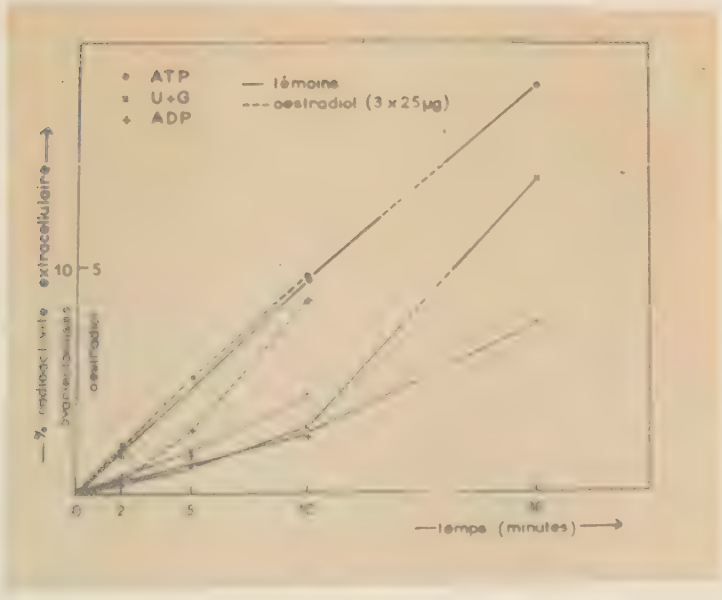


Figure 7: Radioactivité spécifique de l'ATP, de l'ADP et de la somme des uridine et guanosine phosphates de l'utérus au cours de l'incubation.

L'activité spécifique des différents groupes phosphorylés est exprimée en % de l'activité spécifique du phosphate extracellulaire.

- Adénosine-triphosphate: (groupe phosphorylé terminal).

Pour tous les temps d'incubation, l'activité spécifique du groupe phosphorylé terminal de l'ATP est la même que celle du phosphate minéral intracellulaire, aussi bien chez les rats ovariectomisés témoins que chez les rats injectés d'oestradiol ou d'oestradiol et de progestérone. La vitesse de renouvellement de ce groupe semble donc très rapide dans l'utérus isolé, ce qui contraste avec les résultats obtenus sur le diaphragme et pourrait être interprété comme une conséquence de l'activité autonome du muscle lisse *in vitro*. De toute façon, le fait que le phosphate minéral intracellulaire et le phosphate terminal de l'ATP soient en équilibre quelles que soient les conditions d'expérience ne permet pas de déceler une action éventuelle de l'oestradiol sur la vitesse de renouvellement de ce groupe.

- Adénosine-diphosphate:

La comparaison entre les Tableaux XXI et XXII, ainsi que la figure 7, montrent que l'équilibre entre le phosphate labile de l'ADP et le phosphate terminal de l'ATP (et par conséquent le phosphate minéral intracellulaire qui possède la même activité spécifique) est beaucoup plus rapide chez les animaux injectés d'oestradiol que chez les animaux témoins. L'addition de progestérone à l'oestradiol injecté (Tableau XXIII) ne modifie pas d'une façon significative les effets de l'oestradiol seul sur la vitesse de renouvellement de l'ADP.

- Guanosine et uridine phosphates:

L'augmentation de la vitesse de renouvellement de la somme des groupes labiles des guanosine et uridine phosphates sous l'influence de l'oestradiol est également notable. (Tableaux XXI à XXII et figure 7). Elle est cependant moins nette que celle de l'ADP, il faut se souvenir que le taux de ces nucléotides augmente beaucoup sous l'influence de l'oestradiol (+ 200%) et que ce pourcentage d'augmentation est maintenu pendant l'incubation. La radioactivité totale incorporée dans cette fraction, à un instant donné, est beaucoup plus élevée chez l'animal traité à l'oestradiol que chez le témoin.

- Phosphate "résiduel":

Cette fraction est très importante dans l'utérus puisque les quantités trouvées représentent 20 à 30% du phosphate acidosoluble total, alors qu'elles ne forment dans le diaphragme que 5 à 6% du phosphate acidosoluble total. La vitesse de renouvellement de cette fraction est rapide dans le diaphragme, dans l'utérus au contraire cette fraction semble inclure des composés phosphorylés métaboliquement peu actifs, car, l'activité spécifique de l'ensemble du phosphate "résiduel" ne dépasse jamais 10% de celle du groupe terminal de l'ATP.

D I S C U S S I O N

Nous venons d'exposer les résultats obtenus dans l'étude des composés phosphorylés du muscle strié (diaphragme) et du muscle lisse (utérus). Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence un certain nombre de faits concernant le taux des phosphates, la vitesse de pénétration du phosphate minéral à l'intérieur des cellules, l'incorporation du phosphate radioactif dans les composés phosphorylés et l'activité spécifique des différents phosphates labiles. Nous discuterons séparément les résultats obtenus sur le muscle strié et le muscle lisse.

I - MUSCLE STRIE (diaphragme).

L'étude *in vivo* ne nous ayant pas permis de mesurer sur le diaphragme la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés, seuls les résultats obtenus *in vitro* seront discutés.

1 - Taux des composés phosphorylés.

Nous avons vu plus haut que, sauf en ce qui concerne le phosphate "résiduel" le taux des composés phosphorylés du diaphragme incubé, plus faible que celui de l'organe prélevé directement après la mort de l'animal, ne variait pas de façon significative, chez le rat normal ou ovariectomisé, sous l'influence de l'insuline ou de l'hormone de croissance. La constance du taux des nucléotides, pour les divers temps d'incubation utilisés au cours de ce travail, simplifie l'interprétation des résultats; elle permet de négliger des accélérations de la vitesse de renouvellement de certains composés occasionnées par une baisse de leurs niveaux au cours de l'incubation.

2 - Vitesse de pénétration du phosphate minéral.

La vitesse de pénétration du phosphate minéral dans le diaphragme incubé peut être étudiée grâce au pourcentage de la radioactivité spécifique du phosphate minéral intracellulaire par rapport à celle du phosphate minéral extracellulaire. Nous

n'avons pas trouvé de variations significatives de la pénétration du phosphate sous l'influence de l'insuline ou de l'hormone de croissance, cette pénétration est également indépendante de la présence ou de l'absence de substrats dans le milieu d'incubation. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Park (214) qui a trouvé une augmentation de la pénétration du phosphate dans le coeur isolé et perfusé de rat sous l'influence de l'insuline. Cette contradiction s'explique peut-être par les différences qui existent entre les deux tissus: l'un le coeur, a des fibres musculaires intactes, tandis que les fibres musculaires de l'autre, le diaphragme, sont coupées lors de la dissection. D'autre part, les résultats obtenus semblent indiquer que le phosphate minéral intracellulaire se marque le premier, avant le groupe phosphorylé terminal de l'ATP qui est lui-même le précurseur des autres phosphates organiques. En effet, in vivo, le phosphate minéral intracellulaire est à chaque instant en équilibre isotopique avec la phosphocréatine et les deux groupes labiles de l'ATP, alors qu'in vitro sa radioactivité spécifique est plus élevée que celle de ces composés. Ainsi, semble exclue la possibilité d'un marquage direct des phosphates organiques, en particulier de l'ATP, à partir du phosphate minéral extracellulaire. Ceci est en accord avec des résultats récents de Fleckenstein et al. (39, 215) qui ont étudié l'incorporation de ^{18}O dans les liaisons P — O et ont trouvé une incorporation beaucoup plus élevée dans le phosphate minéral intracellulaire que dans l'ATP, alors qu'il n'y a pas d'incorporation spontanée de ^{18}O dans le phosphate minéral, ce qui indiquerait que la pénétration du phosphate dans la cellule est un phénomène actif qui ne nécessite pas une participation stoechiométrique d'ATP.

La vitesse de pénétration du phosphate dans le milieu intracellulaire varie dans le même sens que la concentration en ions Mg^{++} qui n'influe pas sur la vitesse de renouvellement des nucléotides.

3 - Influence de l'insuline et de l'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme: activité spécifique des différents phosphates labiles.

a) Insuline:

L'insuline augmente dans tous les cas, d'une façon significative, l'incorporation de phosphate marqué dans la somme des phosphates organiques labiles. Cet effet, indépendant de la présence de glucose, est à rapprocher d'un certain nombre d'actions

de l'insuline, mises en évidence au cours de ces dernières années (32, 61, 63, 64) et s'exerçant sur différents tissus en survie en l'absence de glucose. Cela ne signifie pas que l'action de l'insuline sur le transport et l'espace de distribution du glucose ne soit pas un effet direct, mais cela indique clairement que l'insuline peut également agir directement sur une autre réaction métabolique du muscle, sans que cet effet, pour se produire, nécessite une pénétration accrue de glucose.

L'étude de l'incorporation de phosphate radioactif ^{32}P dans les différents phosphates labiles va permettre de préciser la nature de l'effet de l'insuline. Une influence de l'insuline sur la vitesse de renouvellement de ces composés peut être due soit à une modification du métabolisme qui se reflète dans l'activité spécifique des différents groupes phosphatés labiles, soit à une pénétration accrue de phosphate dans un compartiment intracellulaire, habituellement non accessible, où se produiraient essentiellement des réactions de phosphorylation, par exemple dans les sarcosomes. Dans ce dernier cas, les modifications de l'activité spécifique des différents phosphates labiles n'indiqueraient pas les modifications du métabolisme provoquées par l'insuline en l'absence de glucose, mais simplement le sens de ce métabolisme dans le compartiment nouvellement ouvert sous l'influence de cette hormone. Il est impossible à l'heure actuelle d'éliminer d'une façon certaine l'une ou l'autre possibilité; pourtant, si la seconde hypothèse était vraie, une incubation prolongée (Tableau VIII) qui entraîne un plus grand équilibre isotopique entre le phosphate minéral intracellulaire et les phosphates organiques du diaphragme, devrait, comme le fait l'insuline également augmenter l'équilibre entre ces différents phosphates organiques, ce qui n'est pas le cas. Aussi, nous ne retiendrons que l'hypothèse d'une modification du métabolisme sous l'influence de l'insuline.

Dans le diaphragme de rat normal (Tableaux VIII et IX) où l'insuline augmente le marquage de tous les phosphates organiques, son action s'exerce préférentiellement sur l'ADP et se traduit par un plus grand équilibre isotopique entre les deux phosphates labiles de l'ATP. Ceci pourrait être dû à une plus grande hydrolyse de l'ATP en AMP et pyrophosphate, ou bien à une plus grande déphosphorylation de l'ADP sous l'action de la myokinase, l'AMP formé étant rephosphorylé par l'adénylate kinase en adénosine-diphosphate. Il semble que l'on puisse écarter l'hypothèse d'une intervention de la myokinase, qui ne devrait se produire que dans un muscle dont la teneur en ATP est descendue à un niveau très bas, ce qui n'est pas le cas, comme l'indique le taux parfaitement constant d'ATP et de phosphocréatine pour tous les temps d'incubation

utilisés au cours de ce travail. De plus, il apparaît, en considérant l'équilibre isotopique qui existe à chaque instant entre la phosphocréatine et le phosphate termina de l'ATP, que la rephosphorylation de la créatine par l'ATP s'effectue normalement, ce qui est une indication supplémentaire du maintien du muscle en état d'équilibre.

Trois réactions sont connues dans le métabolisme pour provoquer une hydrolyse de l'ATP en AMP et pyrophosphate: la biosynthèse d'ARN (7, 8), l'activation des acides aminés (4) et des acides gras (3).

Une intervention massive du premier mécanisme dans l'effet constaté doit être écartée car il lui faudrait pour se produire la participation de quantités approximativement égales des trois autres triphosphates, et il semble que l'un d'entre eux notamment, le cytidine-triphosphate, n'est présent qu'en quantité extrêmement faible.

L'insuline provoque une augmentation de la synthèse protéique (58, 59, 60, 61) ainsi que celle de composés peptidiques liés au glucose, comme l'ont montré Walaas et al. (216).

Une hydrolyse de l'ATP en AMP et pyrophosphate peut être également due à une activation accrue, sous l'influence de l'insuline, des acides gras qui sont, comme le montre le travail de Neptune et al., (217, 218), le principal substrat du métabolisme oxydatif du diaphragme au repos, maintenu en survie.

Il semble peu probable que pour des temps d'action de l'insuline, aussi courts que 10 minutes, l'activation de la biosynthèse des protéines ainsi stimulées, soit suffisante pour expliquer l'augmentation de près de 100% de l'activité spécifique de l'ADP; aussi, doit-on conclure que cette augmentation est due essentiellement à une dégradation accrue des acides gras. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus sur les rats hypophysectomisés (Tableau X). En effet, les muscles des rats hypophysectomisés doivent avoir perdu, surtout chez l'animal à jeun, l'essentiel de leur glycogène. En absence de tout substrat ajouté, les acides gras sont donc, dans le diaphragme en survie de tels animaux, le seul substrat disponible du métabolisme oxydatif. L'action de l'insuline confirme ce fait puisqu'elle provoque une augmentation de 130% de l'activité spécifique de l'ADP, qui atteint presque l'équilibre isotopique avec le groupe terminal de l'ATP.

En revanche, si l'on ajoute du glucose dans le milieu d'incubation, l'action de l'insuline porte alors essentiellement sur le groupe terminal de l'ATP, comme si

le métabolisme s'orientait vers une dégradation accrue du glucose et non plus des acides gras. Une telle dégradation, préférentielle du glucose par les diaphragmes en survie des animaux hypophysectomisés, semble en accord avec les fortes consommations de glucose constatées pour ces mêmes diaphragmes par de nombreux auteurs (219, 220, 221). Il est vrai qu'une telle augmentation n'a pas été constatée pour un tissu musculaire dont les fibres sont maintenues intactes (49) mais l'insuline supprime l'inhibition de la phosphorylation du glucose constatée sur un tel tissu provenant d'animaux diabétiques (80).

Les résultats obtenus, au cours du présent travail, sur les diaphragmes provenant d'animaux hypophysectomisés, sont donc en accord avec les effets connus de l'hypophysectomie sur le métabolisme du muscle.

L'action de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme de rat hypophysectomisé, injecté d'hormone de croissance (Tableau XXI), provoque une augmentation de l'activité spécifique du groupe terminal de l'ATP, c'est-à-dire, une augmentation du catabolisme des glucides, qui est indépendante de la présence ou de l'absence de substrats. Le fait que cette action soi indépendante de la présence de substrats s'accorde bien avec l'effet glycostatique connu de l'hormone de croissance: (76): il ne semble pas que les diaphragmes isolés de rats traités par cette hormone dépendent encore d'un apport de glucose extérieur comme cela avait été constaté pour les rats hypophysectomisés témoins, mais il est surprenan que l'addition de β-hydroxybutyrate au milieu d'incubation ne provoque pas le catabolisme préférentiel de ce substrat par un phénomène inverse de celui qui avait été constaté chez le rat hypophysectomisé en présence de glucose. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de donner une explication satisfaisante de cette contradiction, l'acide β-hydroxybutyrique n'est peut-être pas un substrat adéquat pour le diaphragme isolé.

b) Hormone de croissance:

Les résultats du Tableau XII-A et B montrent que l'action de l'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme est identique en présence et en absence de substrats. L'augmentation significative de l'activité spécifique de l'ADP indique qu'une hydrolyse accrue de l'ATP en AMP et pyrophosphate se produit dans le diaphragme sous l'influence de cette hormone. Un tel effet, analogue à celui que nous obtenons avec l'insuline, serait dû à l'activation de la synthèse protéique et de la dégradation des acides gras qui, nous l'avons vu, se produit sous l'influence de l'hormone de croissance. L'essentiel de l'augmentation de l'activité spécifique de l'ADP,que nous constatons sous l'influence de cette hormone, est probablement dû à un catabolisme accru des acides gras. Ceci est confirmé, semble-t-il, par la diminution significative du taux du phosphate "résiduel", c'est-à-dire principalement des intermédiaires de la glycolyse.

L'augmentation, en l'absence de substrats, sous l'influence de l'hormone de croissance, de l'activité spécifique de la somme des uridine et guanosine nucléotides pourrait être due à une augmentation de la vitesse de renouvellement du GTP, qui, nous l'avons vu, participe à la synthèse protéique (23).

En présence de substrats, l'augmentation de l'activité spécifique de la somme des uridine et guanosine nucléotides est encore plus importante et pourrait s'expliquer par une augmentation de la vitesse de renouvellement de l'UDP-G qui participe à la synthèse du glycogène (222, 223). Une analyse détaillée des activités spécifiques des différents composés de la somme des uridine et guanosine nucléotides sera nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

L'action conjointe de l'hormone de croissance et de l'insuline a été discutée dans le paragraphe précédent. Nous avons vu qu'elle pouvait s'expliquer essentiellement par l'action glycostatique de l'hormone de croissance d'une part, et la stimulation du catabolisme de ce glycogène par l'insuline d'autre part.

II - MUSCLE LISSE (utérus).

Plusieurs auteurs (224, 212, 213) ont étudié le taux des phosphates dans l'utérus. Ils ont indiqué pour l'ATP et la phosphocréatine des valeurs extrêmement faibles et n'ont pu mettre en évidence aucune action de l'oestradiol sur le taux de ces composés.

Borell (212, 213) a montré, de plus, une augmentation de l'incorporation de ^{32}P dans les phosphates organiques labiles de l'utérus de lapin *in vivo*, sous l'influence de l'oestradiol. Cet auteur pourtant, n'a pas étudié séparément la vitesse de pénétration du phosphate radioactif dans la cellule de l'utérus et la vitesse de renouvellement des phosphates labiles qu'il n'a pas séparés spécifiquement. Le présent travail a permis par une étude *in vivo* et *in vitro*, de l'action de l'oestradiol sur l'utérus de rat, de préciser l'ensemble de ces phénomènes.

1 - Taux des composés phosphorylés.

Le taux des nucléotides adényliques est plus faible dans l'utérus que dans le diaphragme. Au contraire, le taux des nucléotides uridyliques et guanyliques, très faible dans le diaphragme, est beaucoup plus élevé dans l'utérus (Tableaux XVI et XVII); nous n'avons pas constaté de variations du taux de l'ATP au cours des 20 premières heures de l'action de l'oestradiol (figures 5 et 6), cependant, la synthèse d'ATP augmente considérablement puisque le poids de l'utérus s'accroît fortement au cours de cette période. Au-delà de ce temps, l'action de l'oestradiol se traduit par une augmentation du taux des adénosine. nucléotides d'environ 50% chez les rats impubères et d'environ 100% chez les animaux ovariectomisés. Cette augmentation est en accord avec la biosynthèse accrue du noyau de l'adénine constatée par Jervell *et al.* (151) dans l'utérus de rat sous l'influence de l'oestradiol.

Le taux de la somme des uridine et guanosine nucléotides n'augmente pas non plus au cours des 20 premières heures d'action de l'oestradiol, mais ensuite son accroissement est beaucoup plus important que celui des dérivés de l'adénosine puisqu'il atteint finalement 300% de la valeur initiale. Les résultats obtenus ne permettent pas de connaître l'augmentation individuelle des uridine et guanosine phosphates. Les taux relativement élevés des nucléotides guanyliques et uridyliques que l'on observe dans l'utérus et leur augmentation sous l'influence de l'oestradiol (Tableau XVIII) peuvent

être liés à la biosynthèse de glycoprotéines et de mucopolysaccharides constatée dans l'utérus sous l'influence de cette hormone.

Les résultats obtenus par addition de progestérone à l'oestradiol injecté montrent que la progestérone provoque une augmentation spécifique de l'uridine diphosphoacétylglucosamine et des guanosine phosphates qui interviennent dans la biosynthèse des glycoprotéines et des mucopolysaccharides. Un tel effet peut être relié à l'action connue de la progestérone qui stimule le développement de l'endomètre.

Le taux des nucléotides dans l'utérus incubé est plus faible, comme pour le diaphragme, que dans l'organe prélevé directement après la mort de l'animal, ce taux reste constant pour les divers temps d'incubation utilisés au cours de ce travail.

2 - Pénétration du phosphate minéral dans l'espace intracellulaire.

La vitesse de pénétration du phosphate minéral, *in vitro*, dans l'utérus est approximativement du même ordre que dans le diaphragme. L'oestradiol provoque un ralentissement de la pénétration du phosphate: ce phénomène est peut-être dû à une augmentation du potentiel de la membrane cellulaire sous l'influence de cette hormone. En effet, suivant Goto et Csapo (225) ce potentiel est de 30 à 35 millivolts chez le lapin impubère et de 43 à 48 millivolts chez l'animal traité à l'oestradiol. La progestérone, qui selon ces auteurs, augmente le potentiel de membrane jusqu'à 55-60 millivolts, ne modifie pas dans nos expériences la vitesse de pénétration des phosphates (Tableau XXIII) qui est identique à ce qu'elle est avec l'oestradiol.

En revanche, nous avons vu qu'*in vivo* le phénomène est tout différent: l'oestradiol provoque une augmentation de la pénétration du phosphate minéral à l'intérieur de la cellule de l'utérus. Cette différence pourrait s'expliquer par l'existence *in vivo* d'une barrière supplémentaire qui s'oppose à la diffusion du phosphate. *In vivo*, le phosphate radioactif doit d'abord quitter l'espace intravasculaire pour l'espace extracellulaire, pour pénétrer ensuite dans l'espace intracellulaire. Comme la radioactivité spécifique du phosphate de l'espace intravasculaire diminue, comme nous l'avons indiqué, de 80% au cours des premières minutes qui suivent l'injection de phosphate radioactif,(206), un retard, même léger, dans l'équilibre entre l'espace intravasculaire et l'espace extracellulaire, doit diminuer l'activité spécifique finale des différentes fractions phosphorylées de l'utérus. Le fait que l'oestradiol augmente la vascularisation de l'utérus (117) est peut-être la raison de l'augmentation de la pénétration du phosphate constatée dans ce tissu *in vivo* sous cette influence hormonale.

Ceci indique, sans nul doute, que les phénomènes sont extrêmement différents in vivo et in vitro. Nous devons d'ailleurs signaler à ce sujet qu'aucune mesure de l'espace extracellulaire n'a été possible in vivo dans l'utérus sous l'influence de l'oestradiol.

Comme dans le cas du diaphragme, la vitesse de pénétration du phosphate dans l'espace intracellulaire varie dans le même sens que la concentration en ions Mg^{++}, qui, de même, n'a aucune influence sur la vitesse de renouvellement des nucléotides.

3 - Influence de l'oestradiol et de la progestérone sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés de l'utérus: activité spécifique des différents phosphates labiles.

In vivo, comme pour le diaphragme, les phosphates labiles sont en équilibre isotopique immédiat avec le phosphate minéral intracellulaire, sauf en ce qui concerne la somme des uridine et guanosine nucléotides pour laquelle il a été possible de mettre en évidence une stimulation de la vitesse de renouvellement de ses phosphates labiles sous l'influence de l'oestradiol.

In vitro, la principale différence entre l'utérus et le diaphragme réside dans le fait que l'ATP est toujours en équilibre avec le phosphate minéral intracellulaire. Ceci s'explique pour un muscle autonome qui, même in vitro, conserve toujours une certaine activité contractile spontanée. Il n'a donc pas été possible de mettre en évidence un effet hormonal sur la vitesse de renouvellement de ce groupe, ce qui ne signifie pas qu'une telle action n'existe pas. En revanche, un effet hormonal est visible in vitro sur la vitesse de renouvellement du phosphate labile de l'ADP qui s'équilibre beaucoup plus rapidement avec le phosphate terminal de l'ATP. Cette stimulation, analogue à celle que nous avons constatée sur le diaphragme sous l'influence de l'insuline et de l'hormone de croissance, peut s'expliquer de la même façon, soit par une intervention de la myokinase, soit par une hydrolyse accrue de l'ATP en AMP et pyrophosphate. Une intervention de la myokinase pourrait être due à une augmentation de l'activité contractile spontanée de l'utérus isolé sous l'influence de l'oestradiol: or, nous avons vérifié que l'ocytocine, ajoutée in vitro, n'accélère pas la vitesse d'incorporation de ^{32}P dans l'ADP chez le rat traité à l'oestradiol, ce qui indique que la fréquence des contractions n'a pas d'influence sur la vitesse de renouvellement du second groupe de l'ATP. D'autre part, le taux élevé d'ATP dans les utérus, même après 10 minutes d'incubation, rend l'intervention de la myokinase peu probable. Ainsi, comme

pour le diaphragme, l'augmentation de l'activité spécifique du phosphate labile de l'ADP semble due à une hydrolyse accrue de l'ATP en AMP et pyrophosphate provoquée par l'activation des acides aminés (4) ou des acides gras (3). Une activation accrue des acides aminés dans l'utérus sous l'influence de l'oestradiol serait en accord avec l'hypothèse de Mueller (166) qui pense que l'action primaire de l'oestradiol est d'induire une biosynthèse de protéines.

Une étude plus spécifique de l'influence de l'oestradiol sur les différents constituants, le GTP en particulier, de la somme des uridine et guanosine phosphates, dont la radioactivité est fortement augmentée sous l'influence de cette hormone, serait susceptible de rendre cette hypothèse encore plus vraisemblable. Il faut pourtant se souvenir que les mesures sont faites plusieurs heures après l'injection d'oestradiol ce qui ne permet pas, dans ces conditions, de mettre en évidence la nature de l'effet primaire de cette hormone.

C O N C L U S I O N S

L'ensemble des résultats exposés montre qu'il est possible d'obtenir, grâce à l'analyse des nucléotides d'un tissu, une représentation de l'activité métabolique de ce tissu au moment de l'expérience. Cependant, au moins en ce qui concerne le muscle strié ou lisse, cette étude ne peut se faire commodément qu'in vitro. En effet, dans ces conditions, le métabolisme est suffisamment ralenti pour qu'une mesure de la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés ne fasse pas apparaître un équilibre instantané de tous ces composés avec leur précurseur, le phosphate minéral intracellulaire, comme cela se produit in vivo. D'autre part, ce n'est qu'in vitro, que l'étude de la vitesse de pénétration du phosphate radioactif dans l'espace intracellulaire du muscle, indispensable à une telle mesure, a été possible.

L'action de l'insuline et de l'hormone de croissance sur le muscle strié et de l'oestradiol sur le muscle lisse donne la possibilité de mettre à l'épreuve cette méthode, dans des conditions où les changements métaboliques provoqués par les états physiologiques étudiés sont en grande partie connus et prévisibles.

Dans le cas d'hormones n'agissant pas in vitro (oestradiol ou hormone de croissance), on ne peut pas s'attendre à ce que les changements métaboliques décelés permettent de conclure à l'effet primaire de l'hormone étudiée, mais ils doivent cependant permettre de voir si les changements observés sont en accord ou non avec les effets connus de ces hormones. Il est évident que l'accélération de l'incorporation de ^{32}P dans le deuxième phosphate de l'ADP et dans la somme des uridine et guanosine phosphates, dans l'utérus, sous l'influence de l'oestradiol et dans le diaphragme, sous l'influence de l'hormone de croissance, répondent bien à l'action métabolique de ces hormones.

En revanche, comme l'insuline agit sur le muscle en survie in vitro, il est possible d'analyser son action au moyen de cette méthode d'une façon beaucoup plus précise. Cette étude nous a montré d'abord que l'effet de l'insuline pouvait se passer de la présence de glucose, ce qui indique qu'il ne peut être dû à une augmentation du

transport du glucose à travers la membrane cellulaire. Cette étude a montré ensuite que l'insuline accélère toujours le métabolisme mais que, suivant l'état physiologique du rat dont on prélève le diaphragme et les substrats présents dans le milieu d'incubation, cette stimulation semblait pouvoir s'exercer, soit sur le métabolisme des acides gras, soit sur celui des sucres. Ce phénomène ne permet pas, en lui-même, de dire de quelle façon l'insuline exerce son action, mais indique que cette action sur la cellule se produit en un point beaucoup plus central de la régulation du métabolisme cellulaire que celui que constitue l'accès d'un substrat à l'intérieur de la cellule. Cette interprétation est en accord avec des expériences récentes (64) qui indiquent une modification du"cyto-squelette" des cellules sous l'influence de l'insuline accompagnée d'une biosynthèse de protéines (61).

Dans la mesure où ces interprétations sont exactes, il apparaît, de plus en plus clairement, que l'ignorance dans laquelle nous sommes du mode d'action des hormones est due à ce que nous ne savons encore que peu de chose sur la localisation même des différents phénomènes métaboliques à l'intérieur de la cellule et la façon dont ils s'influencent les uns les autres. Une étude sur un système acellulaire permettrait d'approcher le mode d'action primaire des hormones, mais aucun des résultats obtenus jusqu'à présent, dans ces conditions, ne semble incontestable. En l'absence de tels résultats, l'analyse des nucléotides, comme l'expose ce travail, permet, dans les tous premiers instants de l'action hormonale, de saisir le sens dans lequel le métabolisme a été modifié.

R E S U M E

La détermination du taux et de la vitesse de renouvellement du phosphate minéral et des phosphates labiles, notamment de la phosphocréatine et des nucléotides libres, nous a permis de préciser les actions que pouvaient exercer certaines hormones sur le métabolisme du muscle strié et du muscle lisse.

Cette étude comprend deux parties :

I. MUSCLE STRIE (DIAPHRAGME).

A - Influence de l'insuline sur le taux et la vitesse de renouvellement des nucléotides libres et de la phosphocréatine du diaphragme de rat.

Cette étude a été entreprisé in vivo et in vitro. In vivo, l'équilibre isotopique entre le phosphate minéral intracellulaire et les phosphates labiles des adénosine nucléotides est instantané; In vitro, cet équilibre est très ralenti, d'où la possibilité de mettre en évidence l'influence d'une action hormonale sur la vitesse de renouvellement de ces composés.

Nous avons étudié l'action de l'insuline in vitro, en présence ou en absence contrôlée de substrats ajoutés au milieu d'incubation. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

a) Vitesse de pénétration du phosphate minéral dans le milieu intracellulaire:

Cette vitesse est déterminée en calculant le pourcentage de l'incorporation du phosphate radioactif dans le phosphate minéral intracellulaire par rapport au phosphate minéral du milieu d'incubation. Cette mesure comporte la détermination directe, au moyen du phosphate radioactif employé, de l'espace intracellulaire du diaphragme. L'insuline et la présence de substrats n'ont aucune influence sur cette vitesse de pénétration.

b) Taux et vitesse de renouvellement de la phosphocréatine et des nucléotides libres:

L'insuline et la présence de substrats n'ont aucune influence sur le taux de la phosphocréatine et des nucléotides libres dans le diaphragme. En revanche, l'insuline provoque, dans tous les cas, une augmentation significative de la vitesse de renouvellement de ces composés en absence ou en présence de substrats.

c) Rat normal :

L'insuline provoque une augmentation de la vitesse de renouvellement de l'ensemble des phosphates organiques labiles du diaphragme de 50 à 60 % en absence de glucose et de 30 à 40 % en présence de glucose. L'action de l'insuline se porte sélectivement sur le deuxième phosphate de l'ATP, dont la vitesse de renouvellement est augmentée de 70 à 90 % en présence aussi bien qu'en absence de glucose.

d) Rat hypophysectomisé :

L'insuline provoque, comme chez le rat normal, une augmentation de la vitesse de renouvellement de l'ensemble des phosphates organiques labiles du diaphragme.

En absence de substrats, l'action de l'insuline porte presque exclusivement sur le deuxième phosphate de l'ATP dont la vitesse de renouvellement est augmentée de 130 %.

En présence de substrats, l'action de l'insuline porte essentiellement sur le phosphate terminal de l'ATP (qui est en équilibre isotopique avec le phosphate de la phosphocréatine) dont la vitesse de renouvellement est augmentée de 50 à 60 %.

e) Rat hypophysectomisé injecté d'hormone de croissance antéhypophysaire :

L'insuline provoque une augmentation de la vitesse de renouvellement du phosphate terminal de l'ATP, cette action n'étant pas modifiée par l'addition de substrats au milieu d'incubation.

Ces résultats permettent de tirer les conclusions suivantes :

1) Le mécanisme d'action de l'insuline ne peut s'expliquer seulement par une pénétration accrue de glucose à travers la membrane cellulaire.

2) L'étude séparée de la vitesse d'incorporation du phosphate radioactif dans les deux phosphates labiles de l'ATP permet de penser que l'accélération du métabolisme des nucléotides libres par l'insuline s'expliquerait, suivant les cas, par une augmentation du métabolisme des acides gras (rats témoins et hypophysectomisés sans substrats) ou du métabolisme du glucose et du glycogène (rats hypophysectomisés en présence de substrats et rats hypophysectomisés traités à l'hormone de croissance).

B - Influence de l'hormone de croissance antéhypophysaire sur la vitesse de renouvellement des nucléotides libres du diaphragme de rat hypophysectomisé.

L'injection d'hormone de croissance provoque une augmentation de la vitesse de renouvellement du deuxième phosphate de l'ATP et des phosphates labiles de la somme des nucléotides uridyliques et guanyliques par rapport au rat hypophysectomisé témoin. De telles augmentations s'accordent avec l'accélération du catabolisme des acides gras et de la synthèse protéique provoquée par cette hormone.

II. MUSCLE LISSE (UTERUS).

Nous avons étudié l'influence de l'oestradiol et de la progestérone sur le taux et la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés de l'utérus de rat. Après avoir constaté dans une étude préliminaire que l'oestradiol provoque une augmentation du taux des esters labiles, les résultats obtenus grâce à l'étude du taux des nucléotides libres de l'utérus sous l'influence de cette hormone, par une technique chromatographique, permettent d'expliquer les variations de taux des phosphates labiles constatées précédemment. L'augmentation atteint 50 à 100 % pour les nucléotides adényliques et 200 à 300 % pour la somme des nucléotides uridyliques et guanyliques, suivant qu'il s'agit d'animaux impubères ou ovariectomisés. L'addition de progestérone à l'oestradiol injecté provoque une augmentation d'une fraction phosphorylée très labile qui n'a pu être identifiée jusqu'ici, ainsi que des changements dans le taux relatif des différents nucléotides uridyliques et guanyliques.

La vitesse de pénétration du phosphate minéral dans l'utérus in vitro a été mesurée par une technique identique à celle utilisée pour le diaphragme. Cette vitesse est approximativement deux fois plus lente chez les animaux traités à l'oestradiol que chez les animaux ovariectomisés témoins. L'espace extracellulaire déterminé par cette méthode est différent de l'espace extracellulaire déterminé in vivo par d'autres auteurs.

L'équilibre entre le phosphate labile de l'ADP et le phosphate terminal labile de l'ATP est beaucoup plus rapide chez les animaux traités à l'oestradiol que chez les animaux témoins. En revanche, il n'a pas été possible de mettre en évidence une influence de l'oestradiol sur la vitesse de renouvellement du

phosphate terminal de l'ATP, celui-çi étant, dans l'utérus incubé, en constant équilibre avec le phosphate minéral intracellulaire.

La vitesse de renouvellement de la somme des nucléotides uridyliques et guanyliques est stimulée sous l'influence de l'oestradiol.

La forte augmentation du taux et de la vitesse de renouvellement des nucléotides libres de l'utérus sous l'influence de l'oestradiol est le reflet de la stimulation du métabolisme sous l'influence de cette hormone.

L'étude de la vitesse de renouvellement des métabolites et des coenzymes phosphorylés indique (dans un tissu en survie incubé même pendant des temps très courts) le sens des réactions métaboliques et l'influence sur ce métabolisme de divers états physiologiques.

Dans le cas d'une hormone comme l'insuline, qui agit in vitro, une telle méthode est capable de contribuer à l'étude du mécanisme d'action de cette hormone.

B I B L I O G R A P H I E

1- F. LYNEN et S. OCHOA, Biochim. Biophys. Acta, 12 (1953) 299.

2- T.C. CHOU et F. LIPMANN,J. Biol. Chem., 196 (1952) 89.

3- P. BERG, J. Biol. Chem., 222 (1956) 991.

4- M.B. HOAGLAND, Biochim. Biophys. Acta, 16 (1955) 288.

5- R.S. BANDURSKI, L.G. WILSON et J. SQUIRES, J. Am. Chem. Soc., 78 (1956) 6408.

6- H. HILZ et F. LIPMANN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 41 (1955) 880.

7- E.S. CANELLAKIS, Biochim. Biophys. Acta, 25 (1957) 217.

8- J.J. FURTH, J. HURWITZ, R. KRUG et M. ALEXANDER, J. Biol. Chem., 236 (1961) 3317.

9- A. STEVENS, J. Biol. Chem., 236 (1961) p.c. 43.

10- S.J. WAKIL, J. Am. Chem. Soc., 80 (1958) 6465.

11- F. LYNEN, J. Cellular Comp. Physiol., 45 supp. 1 (1959) 33.

12- M.F. UTTER et H.G. WOOD, J. Biol. Chem., 164 (1946) 455.

13- M. CALVIN, Federation Proc., 13 (1954) 697.

14- W.F.H.M. MOMMAERTS, A.J. BRADY et B.C. ABBOT, Ann. Rev. Physiol., 23 (1961) 529.

15- D. MAZIA, R.R. CHAFFEE et R.M. IVERSON, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.,47 (1961) 788.

16- J.M. RITCHIE et R.W. STRAUB, J. Physiol. (London), 136 (1957) 80.

17- J.F. HOFFMANN, Federation Proc., 19 (1960) 127.

18- R.L. POST, C.R. MERRITT, C.R. KINSOLVING et C.D. ALBRIGHT, J. Biol. Chem., 235 (1960) 1796.

19- P.C. CALDWELL, J. Physiol., (London), 132 (1956) 35 P.

20- L.F. LELOIR, S.C. OLAVARRIA, S.H. GOLDEMBERG et H. CARMINATTI, Arch. Biochem. Biophys., 81 (1959) 508.

21- J.L. STROMINGER, J. Biol. Chem., 234 (1959) 1520.

22- E.B. KELLER et P.C. ZAMECNIK, J. Biol. Chem., 221 (1956) 45.

23- M.B. HOAGLAND, P.C. ZAMECNIK et M.L. STEPHENSON, Biochim. Biophys. Acta, 24 (1957) 215.

24- E. CABIB et L.F. LELOIR, J. Biol. Chem., 206 (1954) 779.

25- J.L. STROMINGER, Biochim. Biophys. Acta, 17 (1955) 283.

26- H.G. PONTIS, A.L. JAMES et J. BADDILEY, Biochem. J., 75 (1960) 428.

27- V. GINSBURG, Federation Proc., 17 (1960) 85.

28- L.F. BORKENHAGEN et E.P. KENNEDY, J. Biol. Chem., 227 (1957) 951.
29- M. SCRIBNEY et E.P. KENNEDY, J. Biol. Chem., 233 (1958) 1315.
30- D.I. ARNON, M. LOSADA, M. NOZAKI et K. TAGAWA, Nature, 190 (1961) 601.
31- M. LOSADA, F.R. WHATLEY et D.I. ARNON, Nature, 190 (1961) 606.
32- D.M. GIBSON, P. AYENGAR et D.R. SANADI, Biochim. Biophys. Acta, 21 (1956) 86.
33- S. OCHOA, A.H. MEHLER et A. KORNBERG, J. Biol. Chem., 174 (1948) 979.
34- R.B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A.F. BRUMM et V.R. POTTER, J. Biol. Chem., 209(1954)23.
35- A. FLECKENSTEIN, J. JANKE et E. GERLACH, Klin. Wochschr., 37 (1959) 451.
36- A. FLECKENSTEIN et J. JANKE, United Nations peacefulluses of Atomic energy, Proceeding of the second international conference (1959), Pergamon Press, London, Paris, New York, Los Angeles, p. 39.
37- J. SACKS, Nature, 183 (1959) 825.
38- K.K. TSUBOI, Arch. Biochem. Biophys., 83 (1959) 445.
39- A. FLECKENSTEIN, E. GERLACH, J. JANKE et P. MARMIER, Naturwissenchaft, 46(1959)365.
40- C.L. GEMMIL, Bull. Johns Hopkins Hosp., 66 (1940) 232.
41- A.B. HASTINGS, C.T. TENG, F.B. NESBETT et A.E. RENOLD, Federation Proc.,11(1952)227.
42- C. de DUVE, B.C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX et F. APPELMANS, Biochem. J., 60 (1955) 604.
43- W.H. PRICE, M.W. SLEIN et S.P. COLOWICK, Federation Proc., 5 (1946) 150.
44- W.C. STADIE et N. HAUGAARD, J. Biol. Chem., 177 (1949) 311.
45- R. LEVINE et M.S. GOLDSTEIN, Recent.Progr. in Hormone Research, 11 (1955) 343.
46- D.M. KIPNIS et C.F. CORI, J. Biol. Chem., 224 (1957) 681.
47- D.M. KIPNIS et C.F. CORI, J. Biol. Chem., 234 (1959) 171.
48- D.M. KIPNIS, Ann. N.Y. Acad. Sci., 82 (1959) 354.
49- H.E. MORGAN, M.J. HENDERSON, D.M. REGEN et C.R. PARK, J. Biol. Chem.,236(1961)253.
50- E. CADENAS, H. HAJI, C.R. PARK et H. RASMUSSEN, J. Biol. Chem., 236 (1961) p.c; 63.
51- L. AUDRAIN et H. CLAUSER, Biochim. Biophys. Acta,38 (1960) 494.
52- C.T.O. FONG, L. SILVER, D.R. CHRISTMAN et I.L. SCHWARTZ, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 46 (1960) 1273.
53- I.L. SCHWARTZ, H. RASMUSSEN, M.A. SCHOESSLER, L. SILVER et C.T.O. FONG, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 46 (1960) 1298.
54- R.L. POST, H.E. MORGAN et C.R. PARK, J. Biol. Chem., 236 (1961) 269.

55- A.I. WINEGRAD et A.E. RENOLD, J. Biol. Chem., 233 (1958) 265.
56- E.G. BALL, D.B. MARTIN et O. COOPER, J. Biol. Chem., 234 (1959) 774.
57- E.G. BALL et O. COOPER, J. Biol. Chem., 235 (1960) 584.
58- I.G. WOOL et M.E. KRAHL, Am. J. Physiol., 196 (1959) 961.
59- K.L. MANCHESTER et M.E. KRAHL, J. Biol. Chem., 234 (1959) 2938.
60- K.L. MANCHESTER et F.G. YOUNG, Biochem. J., 75 (1960) 487.
61- M.E. KRAHL, Biochim. Biophys. Acta, 35 (1959) 556.
62- D.M. KIPNIS et M.W. NOALL, Biochim. Biophys. Acta, 28 (1958) 226.
63- K.L. MANCHESTER, Biochem. J., 81 (1961) 135.
64- R.J. BARRNETT et E.G. BALL, J. Biophys. Biochem. Cytol., 8 (1960) 83.
65- J. SACKS dans W.D. Mc ELROY et B. GLASS, Phosphorus Metabolism, II Symposium Baltimore, Johns Hopkins Univ. Mc. Collum-Pratt Inst., Contrib. p. 653.
66- C.H. LI, H.M. EVANS et M.E. SIMSON, J. Biol. Chem., 159 (1945) 353.
67- A.E. WILHELMI, J.B. FISHMANN et J.A. RUSSEL, J. Biol. Chem., 176 (1948) 735.
68- C.H. LI et H. PAPKOFF, Science, 124 (1956) 1293.
69- C.H. LI, Federation Proc., 16 (1957) 775.
70- J.H. OTTAWAY et R.D. BULBROOK, J. Endocrinol., 12 (1955) 50.
71- M.J. HENDERSON, H.E. MORGAN et C.R. PARK, J. Biol. Chem., 236 (1961) 2157.
72- B.A. HOUSSAY, Endocrinology, 30 (1942) 884.
73- B.A. HOUSSAY et E. ANDERSON, Endocrinology, 45 (1949) 627.
74- R.C. de BODO, M. KURTZ, A. ANCOWITZ et S.P. KIANG, Federation Proc., 9(1950)30 .
75- R.C. de BODO, M. KURTZ, A. ANCOWITZ et S.P. KIANG, Am. J. Physiol.,163(1950) 310.
76- J.A. RUSSEL et A.E. WILHELMI, Endocrinology, 47 (1950) 26.
77- A.E. DRATZ, J.A. RUSSEL et B.M. COWEY, Federation Proc., 15 (1956) 52.
78- C.R. PARK, D.H. BROWN, M. CORNBLATH, W.H. DAUGHADAY et M.E. KRAHL, J. Biol. Chem., 197 (1952) 151.
79- M.S. BRONK et R.B. FISHER, J. Physiol.,(London) 136 (1957) 435.
80- H.E. MORGAN, D.M. REGEN, M.J. HENDERSON, T.K. SAWYER et C.R. PARK, J. Biol. Chem., 236 (1961) 2162.
81- C.H. LI, M.E. SIMPSON et H.M. EVANS, Growth, 12 (1948) 39.
82- A.L. GREENBAUM, Biochem. J., 54 (1953) 400.
83- C.H. LI, M.E. SIMPSON et H.M. EVANS, Arch. Biochem., 23 (1949) 51.
84- J.E. WHITE et F.L. ENGEL, J. Clin. Invest., 37 (1958) 1556.
85- B. LEBOEUF et G.F. CAHILL,Jr., J. Biol. Chem., 236 (1961) 41.

86- A.E. WINEGRAD, W.N. SHAW, F.D.W. LUKENS, W.C. STADIE et A.E. RENOLD, J. Biol. Chem., 234 (1959) 1922.
87- G.S. GORDAN, L.L. BENNETT, C.H. LI et H.M. EVANS, Endocrinology, 42 (1948) 153.
88- O.H. GAEBLER, P.D. BARTLETT et M.J. SWEENEY, Am. J. Physiol., 165 (1951) 486.
89- H.D. HOBERMAN, Yale J. Biol. and Med., 22 (1950) 341.
90- P.D. BARTLETT, dans "Hypophyseal growth hormone Nature and Actions", R.W. SMITH Jr. O.H. GAEBLER et C.N.H. LONG ed., 1955, Mc Graw Hill, New York, p. 204.
91- C.H. LI, I. GESCHWIND et H.M. EVANS, J. Biol. Chem., 177 (1949) 512.
92- A.E. MILMAN et J.A. RUSSELL, Endocrinology, 47 (1950) 114.
93- M.W. NOALL, T.R. RIGGS, L.M. WALKER et H.N. CHRISTENSEN, Science, 126 (1957) 1002.
94- T.R. RIGGS et L.M. WALKER, J. Biol. Chem., 235 (1960) 3603.
95- E. BALIS, K.D. SAMARTH, M.G. HAMILTON et M.L. PETERMANN, J. Biol. Chem.,233(1958) 1152.
96- H.S. di STEFANO, A.D. BASS, H.F. DIERMEIER et J. TEPPERMAN, Endocrinology, 51 (1952) 386.
97- C.H. LI et H.M. EVANS, Recent Progr. in Hormone Research, 3 (1948) 1.
98- E. REID, J. Endocrinol., 13 (1956) 319.
99- H.S. di STEFANO, H.F. DIERMEIER et J. TEPPERMAN, Endocrinology, 57 (1955) 158.
100- A.L. GREENBAUM, C.N. GRAYMORE et I.F. SLATER, J. Endocrinol., 15 (1957) 235.
101- D.B. CATER, B.E. HOLMES et L.K. MEE, Biochem. J., 66 (1957) 482.
102- H.S. di STEFANO et H.F. DIERMEIER, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 92 (1956) 590.
103- S.R.M. REYNOLDS, dans "Physiology of the Uterus", 2ème édition, Paul B. HOEBER Inc. Ed., 1949, New York.
104- G. PINCUS, The Hormones, II, p. 1, 1950 et III, p. 668, 1955, Academic Press, New York.
105- R. COURRIER, Endocrinologie de la gestation, 1945, Masson Ed., Paris.
106- G.C. MUELLER, A.M. HERRANEN et K.F. JERVELL, Recent Progr. in Hormone Research, 14 (1958) 95.
107- E. ALLEN, Cold Spring Harbor Symposia; Quant. Biol., 5 (1937) 104.
108- E. ALLEN, G.M. SMITH et S.R.M. REYNOLDS, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.,37(1937)257.
109- W.R.CRANDALL, Anat. Record., 72 (1938) 195.
110- A.M. HERRANEN et G.C. MUELLER, Biochim. Biophys. Acta, 24 (1957) 223.
111- M.A. TELFER, Arch. Biochem. Biophys., 44 (1953) 111.
112- E. SPAZIANI, Federation Proc., 20 (1961) 198.

113- E.B. ASTWOOD, Endocrinology, 23 (1938) 25.
114- W.R. CAROLL, Endocrinology, 36 (1945) 266.
115- O. HECHTER, L. KROHN et J. HARRIS, Endocrinology, 29 (1941) 386.
116- E. SPAZIANI et C.M. SZEGO, Am. J. Physiol., 197 (1959) 355.
117- C.M. SZEGO et S. ROBERTS, Recent Progr. in Hormone Research, 8 (1953) 419.
118- E. SPAZIANI et C.M. SZEGO, Endocrinology, 63 (1958) 669.
119- E. SPAZIANI et C.M. SZEGO, Endocrinology, 64 (1959) 713.
120- O. HECHTER et G. LESTER, Recent Progr. in Hormone Research, 16 (1960) 139.
121- I.D.K. HALKERSTON, J. EICHHORN, M. FEINSTEIN, E. SCULLY et O. HECHTER, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 103 (1960) 796.
122- M.W. NOALL et W.M. ALLEN, J. Biol. Chem., 236 (1961) 2987.
123- M. KERLY, Biochem. J., 9 (1937) 1544.
124- M. KERLY, Biochem. J., 34 (1940) 814.
125- S. ROBERTS et C.M. SZEGO, J. Biol. Chem., 201 (1953) 21.
126- W.R. CARROLL, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 49 (1942) 50.
127- O. WALAAS, E. WALAAS et F. LÖKEN, Acta Endocrinol., 10 (1952) 201.
128- O. WALAAS, E. WALAAS et F. LÖKEN, Acta Endocrinol., 11 (1952) 61.
129- J. Mc LEOD et S.R.M. REYNOLDS, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 37 (1938) 666.
130- W.J. BO et W.B. ATKINSON, Anat. Record., 113 (1952) 91.
131- O. WALAAS, Acta Endocrinol., 10 (1952) 175.
132- S. BRODY et A. WESTMAN, Acta Endocrinol., 28 (1958) 39.
133- U. BORELL, Acta Endocrinol., 9 (1952) 141.
134- A. HERRANEN et G.C. MUELLER, J. Biol. Chem., 219 (1956) 585.
135- Y. AIZAWA et G.C. MUELLER, J. Biol. Chem., 236 (1961) 381.
136- J.H. LEATHEM, Ann. N.Y. Acad. Sci., 75 (1959) 463.
137- G.W. CORNER et A. CSAPO, Brit. Med. J., 481 (1953) 687.
138- A.T. BEVER, Ann. N.Y. Acad. Sci., 75 (1959) 472.
139- V.P. HOLLANDER, M.L. STEPHENS et T.E. ADAMSON, Endocrinology, 66 (1960) 39.
140- F.V. LUCAS, H.A. NEUFELD, J.G. UTTERBACK, A.P. MARTIN et E. STOTZ, J. Biol. Chem., 214 (1955) 775.
141- M.A. TELFER, Arch. Biochem. Biophys., 44 (1953) 111.
142- A.T. BEVER, J.T. VELARDO et L.F. HISAW, Federation Proc., 12 (1953) 15.
143- S.L. LEONARD,et E. KNOBIL, Endocrinology, 47 (1950) 331.
144- A.L. BEYLER et C.M. SZEGO, Am. J. Physiol., 167 (1951) 768.

145- E.H. FRIEDEN, A.C. STEELE et M.A. TELFER, Federation Proc., 11 (1952) 215.
146- B. JOLLES-BERGERET et F. CHATAGNER, Ann. Nutrition et Aliment., 15 (1961) 1.
147- D.J. Mc CORQUODALE et G.C. MUELLER, J. Biol. Chem., 232 (1958) 31.
148- G.C. MUELLER et A. HERRANEN, Federation Proc., 12 (1953) 24a.
149- G.C. MUELLER, J. GORSKI et Y. AIZAWA, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 47 (1961) 164.
150- M.B. YARMOLINSKY et G.L. de la HABA, Proc. Nat. Acad. Sci.,U.S., 45 (1959) 1721.
151- K.F. JERVELL, C.R. DINIZ et G.C. MUELLER, J. Biol. Chem., 231 (1958) 945.
152- M.A. KHAYYAL et C.M. SCOTT, J. Physiol. (London), 72 (1931) 13 P.
153- W. DIRSCHERL et H. BREUER, Biochem. Z., 324 (1953) 41.
154- P.B. JOEL, D.D. HAGERMAN et C.A. VILLEE, J. Biol. Chem., 236 (1961) 3151.
155- D.D. HAGERMAN et C.A. VILLEE, J. Biol. Chem., 203 (1953) 425.
156- C.A. VILLEE et D.D. HAGERMAN, J. Biol. Chem., 205 (1953) 873.
157- C.A. VILLEE et E.E. CORDON, J. Biol. Chem., 216 (1955) 203.
158- C.A. VILLEE, D.D. HAGERMAN et P.B. JOEL, Recent Progr. in Hormone Research, 16 (1960) 49.
159- P. TALALAY et H.G. WILLIAMS-ASHMAN, Recent Progr. in Hormone Research, 16 (1960) 1.
160- L.J. LANGER et L.L. ENGEL, J. Biol. Chem., 233 (1958) 583.
161- L.J. LANGER, J.A. ALEXANDER et L.L. ENGEL, J. Biol. Chem., 234 (1959) 2609.
162- J. JARABAK, J.A.ADAMS, H.G. WILLIAMS-ASHMAN et P. TALALAY, J. Biol. Chem., 237 (1962) 345.
163- D.D. HAGERMAN et C.A. VILLEE, J. Biol. Chem., 234 (1959) 2031.
164- N.O. KAPLAN, M.N. SWARTZ, M.E. FRECH et M.M. CIOTTI, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 42 (1956) 481.
165- N. HOSOYA, D.D.HAGERMAN et C.A. VILLEE, Biochem. J., 76 (1960) 297.
166- G.C. MUELLER dans la discussion de l'article de D.D. HAGERMAN et C.A. VILLEE "Mechanism of action of estrogens, 1961, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, p. 181.
167- A.M. STEIN et N.O. KAPLAN, Science, 129 (1959) 1611.
168- C.H. LI, J. Biol. Chem., 211 (1954) 555.
169- H. MAIER-HÜSER, H. CLAUSER, P. FROMAGEOT et R. PLONGERON, Biochim. Biophys. Acta, 2 (1952) 232.
170- G.A. LE PAGE et W.W. UMBREIT, J. Biol. Chem., 152 (1944) 593.
171- K. LOHMANN dans C. OPPENHEIMER Handbuch des Biochemie des Menschen und der Tiere Jena, 2ème édition, 1930, supp., p. 133.
172- H.M. KALCKAR, J. Biol. Chem., 154 (1944) 267.

173- H.G. HERS, H. BEAUFAYS et C. de DUVE, Biochim. Biophys. Acta, 11 (1953) 416.
174- R. MARKHAM et J.D. SMITH, Biochem. J., 52 (1952) 552.
175- P.J. HEALD, Biochem. J., 63 (1956) 235.
176- H.E. WADE et D.M. MORGAN, Biochem. J., 60 (1954) 264.
177- W.E. COHN, J. Am. Chem. Soc., 72 (1950) 1471.
178- W.E. COHN et C.E. CARTER, J. Am. Chem. Soc., 72 (1950) 2606.
179- R. BERGVIST et A. DEUTSCH, Acta Chem. Scand., 8 (1954) 1877.
180- H. SCHMITZ, V.R. POTTER, R.B. HURLBERT et D.M. WHITE, Cancer Research, 14(1954)66.
181- J.X. KHIM et W.E. COHN, J. Am. Chem. Soc., 75 (1953) 1339.
182- H. SCHMITZ et G. WALPURGER, Angew. Chem., 71 (1959) 549.
183- G.R. BARTLETT, J. Biol. Chem., 234 (1959) 449.
184- C.J. THRELFALL, Biochem. J., 65 (1957) 694.
185- R.K. CRANE et F. LIPMANN, J. Biol. Chem., 201 (1953) 235.
186- O.H. LOWRY et J.A. LOPEZ, J. Biol. Chem., 162 (1946) 421.
187- G.H. FISKE et Y. SUBBAROW, J. Biol. Chem., 66 (1925) 375.
188- G.H. FISKE et Y. SUBBAROW, J. Biol. Chem., 81 (1929) 629.
189- I. BERENBLUM et E. CHAIN, Biochem. J., 32 (1938) 295.
190- E.A. ZELLER, Helv. Chim. Acta, 32 (1949) 2512.
191- H.A.KREBS et R. HEMS, Biochim. Biophys. Acta, 12 (1953) 172.
192- C.S. HANES et F.A. ISHERWOOD, Nature, 164 (1949) 1102.
193- B.L. STREHLER et J.R. TOTTER, Arch. Biochem. Biophys., 40 (1952) 28.
194- A.H. ENNOR et H. ROSENBERG, Biochem. J., 51 (1952) 606.
195- A.H. ENNOR et L.A. STOCKEN, Biochem. J., 42 (1948) 557.
196- BARKER H., A.H. ENNOR et K. HARCOURT, Aust. J. Sci. Res. B, 3 (1950) 337.
197- N. NELSON, J. Biol. Chem., 153 (1944) 375.
198- M. SOMOGYI, J. Biol. Chem., 160 (1945) 61.
199- R. BOURRILLON et J. MICHON, Bull. Soc; Chim. Biol., 41 (1959) 267.
200- W.E. TREVELYAN, D.P. PROCTER et J.S. HARRISON, Nature, 166 (1950) 444.
201- K. WALLENFELS, Naturwissenchaften, 37 (1950) 491.
202- W.W. UMBREIT, R.H. BURRIS et J.F. STAUFFER, Manometric Techniques and tissue Metabolism, Burgess Pub. C°, Minneapolis, 1951, p. 119;
203- A. FLECKENSTEIN et J. JANKE, Pflüger's Arch. ges. Physiol., 265 (1957) 237.
204- S. HARTH et P. MANDEL, Bull. Soc. Chim. Biol., 43 (1961) 969.
205- D.F. COLE, J. Endocrinol., 7 (1950) 12.
206- F. MATRAY, Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1961.

207- C.Y. KAO, Am. J. Physiol., 201 (1961) 717.

208- L. LISON, Statistique appliquée à la Biologie expérimentale, Gauthiers-Villard, ed. 1958, p. 132.

209- W.F.H.M. MOMMAERTS, dans M.D. Mc ELROY et B. GLASS "Phosphorus Metabolism II" Symposium Baltimore, Johns Hopkins Univ., Mc. Collum-Pratt Inst., Contrib. p. 551, 1952.

210- A.A. RYE-ALERTSEN, O. WALAAS et E. WALAAS, Acta Physiol. Scand., 43 (1958) 105.

211- D.H. BROWN, C.R. PARK, W.H. DAUGHADAY et M. CORNBLATH, J. Biol. Chem., 197 (1952) 167.

212- U. BORELL, Acta Endocrinol., 7 (1951) 17.

213- U. BORELL, Acta Endocrinol., 8 (1951) 131.

214- C.R. PARK, H. KAJI, M. SMITH, D. ORTH et H.E. MORGAN, Vème Congrès International de Biochimie, Résumé des Communications, Pergamon Press Ltd., Oxford, Londres, New York, Paris, 1961, p. 263.

215- J. JANKE, P. MARMIER, A. FLECKENSTEIN et E. GERLACH, Pflüger's Arch. ges Physiol., 274 (1961) 6 comm.

216- O. WALAAS, B. BORREBAEK, T. KRISTIANSEN et E. WALAAS, Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 562.

217- E.M. NEPTUNE Jr., H.C. SUDDUTH, F.J. FASH et D.R. FOREMAN, Am. J. Physiol., 196 (1959) 269.

218- E.M. NEPTUNE Jr., H.C. SUDDUTH, F.J. FASH et D.R. FOREMAN, J. Biol. Chem., 234 (1959) 1659.

219- M.E. KRAHL et C.R. PARK, J. Biol. Chem., 174 (1948) 939.

220- C.A. VILLEE et A.B. HASTINGS, J. Biol. Chem., 179 (1949) 673.

221- K.L. MANCHESTER, P.J. RANDLE et F.G. YOUNG, J. Endocrinol., 18 (1959) 395.

222- J. LARNER, C. VILLAR-PALASI et D.J. RICHMAN, Ann. N.Y. Acad. Sci., 82 (1959) 345.

223- C. VILLAR-PALASI et J. LARNER, Biochim. Biophys. Acta, 39 (1960) 171.

224- O. WALAAS et E. WALAAS, Acta Physiol. Scand., 21 (1950) 1.

225- M. GOTO et A. CSAPO, J. Gen. Physiol., 43 (1959) 455.

TABLE DES MATIERES

page

INTRODUCTION .....

I - Rôle des nucléotides dans le métabolisme et mesure de leur taux et de leur vitesse de renouvellement dans les tissus 1

II - Etude de l'influence de l'insuline et de l'hormone de croissance antéhypophysaire sur le métabolisme du muscle strié. 6

III- Etude de l'influence de l'oestradiol sur le métabolisme du muscle lisse 15

MATERIEL ET METHODES 24

I - Produits 24

II - Animaux et traitements 25

III- Préparation de l'extrait trichloracétique de muscle 26

IV - Fractionnement et dosage des différents constituants de l'extrait trichloracétique 27

A - Aperçu général 27
B - Méthodes employées 28

1- Dosage des phosphates 28
2- Détermination des phosphates suivant leur vitesse d'hydrolyse 31
3- Fractionnement des nucléotides libres par chromatographie 31
4- Dosage spécifique de l'adénosine triphosphate 34
5- Dosage spécifique de la créatine et de la phosphocréatine 35
6- Dosage du glucose 36
7- Mesure de la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés au moyen de ^{32}P 37
8- Mesure de l'espace extracellulaire de l'utérus et du diaphragme incubés..... 42
9- Calculs statistiques 44

ETUDE DU TAUX ET DE LA VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES D'UN MUSCLE STRIE: LE DIAPHRAGME 46

I - Taux du phosphate minéral, de la phosphocréatine et des nucléotides libres du diaphragme 46

II- Vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme in vivo 53

III- Vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme in vitro 54

1- Etude de l'action de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme 54

2- Etude de l'action de l'hormone de croissance sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés du diaphragme de rat hypophysectomisé 64

ETUDE DU TAUX ET DE LA VITESSE DE RENOUVELLEMENT DES COMPOSES PHOSPHORYLES D'UN MUSCLE LISSE, L'UTERUS. INFLUENCE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE L'ANIMAL 67

I - Influence de l'oestradiol et de la progestérone sur le taux des fractions phosphorylées et de la phosphocréatine dans l'utérus de rat 67

II - Influence de l'oestradiol et de la progestérone sur le taux des nucléotides de l'utérus de rat impubère ou ovariectomisé .. 71

III- Influence de l'oestradiol et de la progestérone sur la vitesse de renouvellement des composés phosphorylés de l'utérus de rat 76

DISCUSSION 83

I - Muscle strié (diaphragme) 83

II - Muscle lisse (utérus) 89

CONCLUSIONS 93

BIBLIOGRAPHIE 99

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

" Voies métaboliques du glucose ".

Vu et approuvé :

Paris, le 24 Mai 1962.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

M. ZAMANSKY

Vu
et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE